UNTERSUCHUNGEN ZUM MEMBRANTRANSPORT VON K^+, CA^{++} UND CL^- AN PLASMALEMMA UND TONOPLAST BEI RICCIA FLUITANS

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
HINRICH LÜHRING
aus Oldenburg

1981

81 396

UNTERSUCHUNGEN ZUM MEMBRANTRANSPORT VON K^+, CA^{++} UND CL^- AN PLASMALEMMA UND TONOPLAST BEI RICCIA FLUITANS

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
HINRICH LÜHRING
aus Oldenburg

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung : 30.07.1981

Dekan : Prof. Dr. A. Hager

1. Berichterstatter : Prof. Dr. F.W. Bentrup

2. Berichterstatter : Prof. Dr. A. Hager

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Meinen Eltern und Karin.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548903_0017

Beim Abschluß dieser Arbeit möchte ich besonders danken

- Herrn Prof. Dr. F.W. Bentrup, der Thema, Arbeitsplatz und fortwährende Bereitschaft zu anregenden Diskussionen zur Verfügung stellte;

- den Mitarbeitern der Abteilung Biophysik für viele hilfreiche Diskussionen;

- der Werkstatt des Instituts für Biologie I, die mit Rat und vor allem Tat beim Aufbau meines Meßplatzes mitwirkte.

Inhalt.

Einleitung 1

Verwendete Zeichen und Abkürzungen 4

1. Material und Methoden 5

1.1 Material 5

1.2 Versuchsmedien 6

1.3. Versuchsaufbauten und Kontrollbedingungen 8

1.4. Potentialmessung und Stromapplikation 10

1.5. Flußmessung 12

Ergebnisse 15

2. CCCP-Wirkung und Temperaturabhängigkeit des elektrogenen Transports 15

2.1. Elektrophysiologische Experimente 15

2.1.1. Verhalten des Plasmalemma- und Tonoplastenpotentials nach CCCP-Applikation 15

2.1.2. Wirkung von CCCP auf den Plasmalemma-Widerstand 17

2.1.3. Wirkung von CCCP auf den Membranwiderstand (Plasmalemma und Tonoplast in Serie) 18

2.1.4. Strom/Spannungs-Kennlinie des Plasmalemmas 18

2.2. Effluxversuche zur CCCP- und Temperatur-abhängigkeit der Membranen Plasmalemma und Tonoplast 19

2.2.1. Ionengehalt der Zellkompartimente Cytoplasma und Vakuole in Abhängigkeit von Temperatur und CCCP-Konzentration im Außenmedium 19

2.2.2. Temperaturabhängigkeit und Einfluß verschiedener CCCP-Konzentrationen auf die Transportraten von K/Rb und Cl der Membranen Plasmalemma und Tonoplast 21

2.2.3. Graphische Bestimmung der Aktivierungsenergie für den Transport von Ionen über Plasmalemma und Tonoplast, Vergleich von K/Rb mit Cl 23

3. Einfluß der Ca-Konzentration im Außenmedium 26

3.1. Elektrophysiologische Versuche 26

3.1.1. Einfluß auf das Membranpotential von Thalluszellen 26

3.1.2. Einfluß auf das Membranpotential von Rhizoidzellen 28

3.1.3. Widerstandsänderung der Membran nach Ca-Zufuhr 28

3.1.4. Strom/Spannungs-Kennlinien der Rhizoidmembran nach Änderung der Ca-Konzentration 28

3.2. Ca- und K/Rb-Efflux 29

3.2.1. Ca-abhängiger Efflux von K/Rb und Ca 29

3.2.2. Verhältnis des Ionengehalts von Vakuole und Cytoplasma 30

Diskussion 31

4.1. Allgemeines zum Membrantransport 31

4.2. Evidenz einer elektrogenen Pumpe bei Riccia fluitans 32

4.3. Wirkung von CCCP auf das elektrische Verhalten der Riccia-Membranen 35

4.4. I/U-Kennlinie des Plasmalemma 36

4.5. Einfluß von CCCP auf die K/Rb- und Cl-Transportraten der Membranen 37

4.6. Einfluß von Ca auf das Membranpotential 40

4.7. Membranwiderstand und I/U-Kennlinie am Rhizoid 41

4.8. Ca- und K/Rb-Efflux in Abhängigkeit von der externen Ca-Konzentration 43

Zusammenfassung 45

Appendix 1. Küvetten-Kinetik 48

Appendix 2. Aufnahme der Strom/Spannungs-Kennlinie 50

Appendix 3. Einsatz von Doppelelektroden 55

Literatur 57

Abbildungen F ... 62

Lebenslauf und akademische Lehrer 106

Einleitung.

Zur in vivo-Charakterisierung der Membrantransportmechanismen ist das von FELLE (1974) eingeführte Objekt Riccia fluitans geeignet. Die Pflanze aus der Ordnung Marchantiales bringt sowohl zu elektrophysiologischen als auch radioaktiven tracer Fluß-Messungen wünschenswerte Voraussetzungen mit: Der wenige Zellagen dicke Thallus mit großen Interzellularen bietet ein günstiges Oberflächen-Volumenverhältnis zur Flußmessung, an der Unterseite wachsende, farblose Rhizoidzellen ermöglichen Widerstandsmessungen an der Plasmamembran; wegen der einfachen Geometrie der Rhizoide (langgestreckte Zylinder mit großer, zentraler Vakuole) kann das elektrische Membranverhalten spezifiziert werden.

Riccia fluitans ist seit 1974 von FELLE und BENTRUP eingehend untersucht worden im Hinblick auf das Transportverhalten der Plasmamembran (FELLE und BENTRUP, 1976; FELLE und BENTRUP, 1977; BENTRUP, Review 1980); neben einem passiven existiert auch ein elektrogenes, aktives Transportsystem.

Wurde bisher von der 'Plasmamembran' gesprochen, so fehlen detaillierte Informationen über das Verhalten des Tonoplasten, der nach BENTRUP 'im Meßschatten des Plasmalemmas' liegt. Diese Bemerkung ist zutreffend, da eine zum Plasmalemma unterschiedliche Charakteristik dieser Membran anzunehmen ist.

Aus früheren Versuchen zur Bestimmung des intrazellulären pH (FELLE, 1974; LÜHRING, 1976) wurde das vakuoläre pH auf etwa 3 bis 3.5 geschätzt. Die elektrischen transients bei Ein- und Ausschalten des Lichts waren mit einer pH-Änderung in der Zelle korreliert; auch dies ist ein Hinweis auf die Existenz einer durch Metabolismus versorgten Protonenpumpe. Offensichtlich ist der Tonoplast, über den ein H-Gradient von größer als 1:1000 aufrechterhalten wird, bedeutsam für die Regulation des pH im cytoplasmatischen Kompartiment. Von Interesse ist somit eine Diskrimination der beiden Membranen, die sich bisher nur in wenigen Arbeiten zur Aufklärung der elektrischen Tonoplasten-Charakteristik fand (GOLDSMITH and CLELAND, 1978; GREENHAM, 1966; DUNLOP 1976). Leider ist die Meßsituation bei den verwendeten Objekten so unglücklich, daß ohne besondere Verfahren, die die in vivo-Bedingungen bedenklich machen, kein direkter Zugang zum Tonoplasten bestand; entweder mußte Cytoplasma durch Zentrifugation an einem Zellende gesammelt werden, oder Potentialänderungen während einer stetigen Penetration der Mikroelektrode durch einen Cortex wurden als Kompartiment-spezifisch interpretiert. Riccia fluitans bietet den Vorteil, an jungen Rhizoidzellen mit großer zentraler Vakuole eine Cytoplasmakappe von 10 bis 20 µM Durchmesser am apikalen Ende auszubilden; somit besteht die Möglichkeit, einer optischen Kontrolle der Elektrodenposition im cytoplasmatischen Kompartiment.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Experimenten, die Aufschluß geben sollen über elektrisches und Transportverhalten des Tonoplasten; die bisherige Arbeit FELLE's am Plasmalemma wurde fortgeführt. Hierzu gehörten Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit des K/Rb- und Cl-Transports; gleichzeitig wird eingegangen auf den Einfluß des Entkopplers CCCP auf die Membraneigenschaften. Es wurden Experimente durchgeführt zur Frage nach der Rolle des Ca auf das Membranverhalten.

Die angewendeten Methoden - Ableitung des Membranpotentials, Widerstandsmessungen und Anwendung von Radionukliden in Flußexperimenten - erlauben in vivo Charakterisierungen der Membranen Plasmalemma und Tonoplast; die Versuchslösungen waren so zusammengestellt, daß die inkubierten Pflanzen lange Zeit (über 1 Monat) unbeschadet blieben.

Verwendete Zeichen und Abkürzungen.

Zeichen	Erläuterung	Dimension
1E+n	Potenz n zur Basis 10	-
α	Koeffizient zum Konzentrationsverh. Cyt./Vak.	-
C(c)	Kopplungskapazität	F
CCCP	Carbonylcyanid m-chlorphenylhydrazon	-
E(a)	Aktivierungsenergie	J/mol
E(j)	Gleichgewichtspotential für das Ion j	V
E(d)	Diffusionspotential	V
E(m)	Membranpotential	V
E(p)	elektromotorische Kraft der elektrogenen Pumpe	V
E(pl)	Potentialdiff. über dem Plasmalemma	V
E(to)	Potentialdiff. über dem Tonoplasten	V
F	Faraday-Konstante	A sec/Äqu.
g(d)	Leitfähigkeit der passiven Membrankanäle	S/m^2
g(p)	Leitfähigkeit der Pumpe	S/m^2
I(c,v)	Aktivitätsgehalt in Cytoplasma bzw. Vakuole	dpm
i(p)	durch elektrogene Pumpe erzeugter Strom	A/m^2
k(w,c,v)	Transportrate über Zellwand (w), Plasmalemma (c) und Tonoplast (v)	1/sec
R(c)	Kopplungswiderstand	Ohm
S	radioaktive Spezifität	dpm/mol

1. Material und Methoden.

1.1. Material.

Das Versuchsobjekt Riccia fluitans ist ein submers lebendes Lebermoos der Ordnung Marchantiales. Pflanzenmaterial wurde entweder dem Tropicarium des Botanischen Gartens der Universität Tübingen entnommen oder, insbesondere während der Wintermonate, eigener Anzucht in einem Aquarium. Der Standort des Aquariums war ein Versuchsgewächshaus im Institut für Biologie I. Konstante Bedingungen waren 295 K Dauertemperatur sowie eine Licht/Dunkel-Periode von 12/12 Stunden.

Für die Experimente wurden ausgesuchte Thalli in den unter 1.2. beschriebenen Testlösungen vorinkubiert, so daß die Anzuchtbedingungen keinen Einfluß auf ihr physiologisches Verhalten nehmen sollten.

Riccia fluitans; Thallus

1.2. Versuchsmedien.

Für alle Experimente wurde künstliches Teichwasser als Test- und Auswaschmedium verwendet. Tabelle 1 gibt die Komponenten der Lösungen an; für Flußexperimente mit Radionukliden wurde ein Teil der entsprechenden unmarkierten Ionen durch das radioaktive Isotop ersetzt. So blieb die ursprüngliche Zusammensetzung des Mediums gewahrt.

Da für die Effluxexperimente unterschiedliche Ausgangsaktivitäten verwendet wurden, variierten die Volumina der eingesetzten radioaktiven Standards. Die dem Testmedium zugegebene Menge war in jedem Fall so bemessen, daß die radioaktive Spezifität 'S' des Mediums bei etwa 1pmol/dpm lag.

Tabelle 1. Medien für elektrische und Effluxexperimente an Riccia fluitans.

Stammlösungen:		
KCL	40 mM	2.9824 g/l
NaCl	40 mM	2.3376 g/l
CaCl2	10 mM	1.4702 g/l
Na2HPO4	38.8 mM	6.906 g/l
NAH2PO4	38.8 mM	5.354 g/l

Die folgenden Systeme (KCl/NaCl und Na-Phosphat-Puffer) können nach Belieben komponiert werden (Angaben für 1l Medium):

ml Stammlösung/Konzentration in 1l (mM)

	I	II	III
KCl	0.25 / 0.01	2.5 / 0.1	25.0 / 1.0
NaCl	24.75 / 0.99	22.5 / 0.9	- / -
CaCl2	10.0 / 0.1	10.0 / 0.1	10.0 / 0.1

ml Stammlösung (Konzentration beider Phosphatsalze im Medium 1.9 mM)

pH	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0
Na2HPO4	0.6	2.5	6.3	14.5	24.5
NaH2PO4	48.4	46.5	42.7	34.5	24.5

Die Ca-Konzentrationen wurden durch Vielfache der CaCl2-Komponente variiert.

ml Stammlösung (CaCl2)

-log(Ca)	3	4	5	6
CaCl2	100	10	1	0.1

1.3. Versuchsaufbauten und Kontrollbedingungen.

In Fig. 1. und 2. sind die Einrichtungen für die elektrischen bzw. Efflux-Experimente dargestellt.In einer Plexiglas-Küvette wurde ein Thallus so fixiert, daß einzelne Rhizoidzellen mühelos mit Glaselektroden erreicht wurden. Ebenso konnten zwei Thalluszellen simultan angestochen und das elektrische Verhalten der Membranen gleichzeitig registriert werden. Die Vorinkubationslösungen waren während des jeweiligen Versuchs Kontroll- und Auswaschmedien (vgl. in Abbildungen die Marken 'wash' oder 'control').

Zur Versuchsvorbereitung wurden Riccia-Thalli in Kulturschalen mit Kontrollmedium überführt. In diesen Schalen blieben sie bis zum Versuchsbeginn unter einem 12/12-Stunden Licht/Dunkel-Wechsel.

Die Präparation für den Versuch bestand in der Auswahl eines Thallus, der Äste mit Rhizoiden besaß. Solch ein Ast wurde abgeschnitten und an der Basis auf einem Träger fixiert, daß das apikale Ende frei lag und die Rhizoidzellen unversehrt, zugänglich im Medium schwimmen konnten. In der Küvette fand unter ständigem Mediumdurchfluß eine etwa einstündige Äquilibrierung an die Umgebung statt. Lichtquelle war die Mikroskoplampe (Mikroskop 'Laborlux' der Fa. E. Leitz), die Tempera-

tur wurde am vorbeifließenden Medium thermostatisiert (Thermostat der Fa. Colora) und mit Hilfe eines Temperaturfühlers (Hugo-Sachs-Elektronik) in der Küvette kontrolliert. Soweit nicht anders angegeben, betrug die Temperatur in der Regel 295 K. Die Beleuchtung brachte die abgeleiteten Membranpotentiale in Sättigung.

1.4. Potentialmessung und Stromapplikation.

Die Membranpotentialmessungen erfolgten intrazellulär; aus Glaskapillaren mit eingeschmolzenem Filament (Fa. Hilgenberg) wurden mit Hilfe eines Elektrodenziehgerätes (David Kopf Instruments 700C, Narishige PN-3, Elektr.ziehger. der Fa. GETRA) Mikropipetten mit einem Spitzendurchmesser von < 1 um gefertigt und mit 3 M KCl gefüllt. In die Salzlösung tauchte ein chlorierter Silberdraht, der verbunden war mit einem Elektrometer (Keithley Instr., Mod. 610C oder Spezialanfertigung pA/mV-Meter mit Eingangswiderständen > 1E+12 Ohm).

Die Glasmikroelektroden wurden unter mikroskopischer Beobachtung mit Manipulatoren (Leitz, Wetzlar) in die Zellen gestochen. Zu Messungen an Rhizoiden dienten Narishige-Manipulatoren als Servo-Geräte zu den Leitz-Manipulatoren; dieser Aufbau gestattete mehrere Stunden Ableitungen mit stabiler Elektrodenposition an intakten Zellen. Referenz im Außenmedium war eine symmetrische, abgebrochene Mikropipette, gefüllt mit 3 M KCl in 1% Agar, die auf Erdpotential lag. Die abgeleitete Potentialdifferenz zwischen Zellinnerem und außen erschien am Ausgang des Elektrometers unverändert (Amplitudenverhältnis 0 dB) und konnte verzerrungsfrei auf einem Schreiber (W+W, Mod. 304 der Fa. Kontron) re-

gistriert werden (Fig. 3.). Ableitungen wurden dann für gültig erachtet, wenn bei Insertion der Mikroelektrode das Membranpotential nur wenige Millivolt vom endgültigen Wert entfernt war.

Zu Widerstandsmessungen, Aufnahmen von Strom/Spannungs-Kennlinien und Ableitung von verschiedenen Kompartimenten wurden zwei sich gegenüberstehende Elektroden gleichzeitig in Rhizoide gestochen. In den ersten beiden Fällen sollte eine Elektrode den Strom injizieren, die zweite leitete die Spannungsantwort ab. Um Widerstandsänderungen bei Variation eines Parameters zu registrieren, wurde auch Strom durch die Spannungselektrode appliziert (Fig. 4.a), oder es kamen sogenannte 'double-barreled' (Doppel-)Elektroden zur Anwendung (siehe Appendix, Fig. 4.b).

Ein Pulsgenerator (Spezialanfertigung) lieferte Rechteckpulse, die von einem Verstärker (Hewlett-Packard, Harrison 6824A) bis zu einer Amplitude von 40 Volt Ausgangsspannung verstärkt wurden. Der Strom war bestimmt durch einen Vorwiderstand (ca. 1E+10 Ohm); gemessen wurde der injizierte Strom als Spannungsabfall über einen 1E+8 Ohm Widerstand in Serie mit dem Vorwiderstand (vgl. Fig. 3).

1.5. Flußmessung.

Die Vorbereitung der Flußmessung bestand wie bei den elektrischen Experimenten in einer Vorinkubation im Versuchsmedium. Zur Lösung wurde radioaktiver tracer gefügt, so daß die spezifische Aktivität etwa 1 pmol/dpm betrug.

Aus Influxversuchen war bekannt, daß die Thalli mit Rb-86 (als K-Ersatz) ca. zwei, mit Cl-36 und Ca-45 ca. sechs Tage zur Aufladung benötigten. Mit Aufladung ist der Zustand gemeint, in dem die radioaktive Spezifität 'S' im Zellinnern gleich der Außenspezifität ist.

Zum Versuch wurden die Pflanzen ihrem Behältnis (Szintillationsfläschchen) entnommen und in eine Plexiglas-Küvette überführt. Nachdem das radioaktive Medium abfließen konnte, wurde die Küvette bis zu einer definierten Marke mit nicht radioaktiv markiertem aber identischem Medium aufgefüllt. In diesem Moment begann der Efflux; in stetigem Durchfluß wurde der tracer aus den Pflanzen eluiert und in bestimmten Zeitintervallen ein konstantes Volumen in Szintillationsfläschchen aufgefangen (vgl. Fig. 2.). Die Messung der Fraktionen im Szintillationszähler (BF 5003 A, Fa. B. Frieseke, Hewlett Packard Tricarb 3385) nach Beendigung des Effluxes ergab in richtiger Reihenfolge der Proben die

Flußraten des untersuchten Ions über die Plasmamembranen. Die eluierten Gewebeproben wurden gefriertrocknet, die Gewichte der trockenen Proben bestimmt und die Aktivitäten aller Fraktionen sowie der im Gewebe verbliebenen Radioaktivität gemessen. Bei Cl-36 Versuchen wurde nach der Gefriertrocknung das Pflanzenmaterial für ca. drei Stunden mit 20 %-igem Wasserstoffperoxid inkubiert, um alles Chlorophyll, das die Zählausbeute verringert, zu zerstören. Da auch Wasserstoffperoxid einen starken Quench ausübt, wurde es in einem Zeitraum von 30 min abgedampft. Für die Bestimmung der Restaktivität aus Rb-86 Versuchen wurde der Chlorophyll-Quench mit Hilfe später durchgeführter Eichmessungen (interner Standard) korrigiert.

Durch Aufaddieren der abgegebenen Radioaktivität zu der im Gewebe verbliebenen erhält man zu jeder Fraktion einen Meßpunkt mit den Koordinaten 'Zeit nach Effluxbeginn/Aktivität im Gewebe'. Die Isotopenflüsse aus der Zelle verhalten sich entsprechend einer Reaktion 1. Ordnung. Somit ist die intrazelluläre Aktivität I(t) als Funktion der Zeit bestimmt durch die Beiträge aller an der Abgabe beteiligten Kompartimente:

$$I(t) = I(w)\exp(-k(w)t)+I(c)\exp(-k(c)t)+I(v)\exp(-k(v)t)$$

hier für die Kompartimente Wand/Cytoplasma/Vakuole.

I(w,c,v) bedeutet den Aktivitätsgehalt des indizierten Kompartiments zu Effluxbeginn (t=0), k(w,c,v) die entsprechende Geschwindigkeitskonstante.

Bei halblogarithmischer Auftragung von I gegen die Zeit t sollte demnach mindestens für den langsamsten, geschwindigkeitsbestimmenden Transportvorgang die Kinetik linear verlaufen, vorausgesetzt, die Eluation wird lange genug durchgeführt.

Ergebnisse.

2. CCCP-Wirkung und Temperaturabhängigkeit des elektrogenen Transports.

2.1. Elektrophysiologische Experimente.

2.1.1. Verhalten des Plasmalemma- und Tonoplastenpotentials nach CCCP-Applikation.

Um die Wirkung des CCCP auf Plasmalemma und Tonoplast getrennt zu registrieren, wurde eine Mikropipette in die cytoplasmatische Kappe, eine zweite in die Vakuole einer Rhizoidzelle gestochen. Optische Kontrolle und ein kurzer Licht/Dunkel-Zyklus zeigten an, wenn die Elektroden von unterschiedlichen Kompartimenten ableiteten. Die große Schwierigkeit bestand darin, nur über kurze Zeiträume (im günstigen Fall wenige Minuten) eine stabile Messung an der Plasmakappe durchführen zu können. Der Rhizoid-Apex ist extrem empfindlich gegenüber mechanischer Belastung; in den meisten Fällen brach das Plasmalemmapotential schon nach 3 bis 5 sec zusammen. Aus diesem Grund konnten nur relativ wenige Meßergebnisse gesammelt werden, obwohl elektrophysiologische Versuche über fast zwei Jahre zu diesem Problem mit etlichen Verbesserungen zur Elektroden-Manipulation durchgeführt wurden. Fig. 6. stellt das typische Verhalten der beiden Membranen Plasmalemma und Tonoplast nach CCCP-Applikation dar. Man findet eine Potentialdifferenz über den Tonoplasten von etwa 50 mV (Vakuole positiv gegenüber dem Cytoplasma); die Poten-

tialdifferenz über das Plasmalemma beträgt ca. -250 mV. Durch den Entkoppler wird eine Depolarisation am Tonoplasten von nahezu 60 mV Amplitude herbeigeführt, die meistens die Nullmarke überschreitet. Ein neues steady state ist nach zwei Minuten erreicht; dieses Niveau ist 20 bis 30 mV negativer als der anfangs registrierte transient.

Das Plasmalemmapotential hingegen wird auf -105 mV depolarisiert, ohne einen transient wie der Tonoplast zu zeigen. In Tabelle 2 sind Ergebnisse aufgelistet, die Auskunft üner das Verhalten der Membranpotentiale über Plasmalemma E(pl) und Tonoplast E(to) nach Anwendung von CCCP geben.

Tabelle 2. : Potentialdifferenzen über Plasmalemma und Tonoplast vor und nach Applikation von CCCP. K+(außen): 1 mM, Licht, 285 k; Anzahl der Messungen n > 5

pH(außen)	E(pl)/mV	E(to)/mV	CCCP/uM	dE(pl)/mV	dE(to)/mV
7.5	-237 (22)	50.5 (15)	10	113 (29)	-48 (12)
5.5	-224 (24)	20 (15)	10	91 (27)	
			1	51 (16	-39 (2)
			.01	40 (14)	

2.1.2. Wirkung von CCCP auf den Plasmalemmawiderstand.

Die Änderung des Input-Widerstands am Plasmalemma gibt Fig. 7. wieder; Stromapplikation und Ableitung der Potentialdifferenz erfolgten mit Hilfe einer 'double-barreled'-Elektrode. Mit Strompulsen konstanter Größe (1E-10 A) konnte die Widerstandsänderung demonstriert werden. Durch CCCP wird das Plasmalemma von -212 mV auf -105 mV depolarisiert. Die Antwort der Membran auf die Strompulse (depolarisierendes Rechteck-Signal) ist ein Merkmal für den Membranwiderstand - je höher die Amplitude der Antwort, desto größer der Widerstand. Wie zu sehen ist, nimmt bei Zuführung von CCCP der elektrische Widerstand des Plasmalemma stetig bis auf ca. 50 % seines Anfangswertes ab. Aus der Abbildung ist weiterhin ersichtlich, daß das Entkopplermolekül in der Membran gelöst wird und dort als Ionenkanal fungiert; nach Auswaschen mit Kontrollmedium sinkt die Leitfähigkeit des Plasmalemmas. Konnte vorher noch angeführt werden, daß die Zunahme an Leitfähigkeit nach CCCP-Applikation daher rühren könne, daß das Membranpotential sich zu einem Niveau bewege, bei dem die Strom/Spannungs-Kennlinie exponentiell ansteigt, die Leitfähigkeitserhöhung also spannungsabhängig ist, so ist hier gezeigt, daß bei gleichem Membranpotential der Widerstand ohne CCCP größer ist als mit diesem Substrat.

2.1.3. Wirkung von CCCP auf den Membranwiderstand (Plasmalemma und Tonoplast in Serie).

Fig. 8. zeigt die Wirkung von CCCP auf den Widerstand beider Membranen in Serie an Rhizoiden. Durch den Entkoppler wird die Zelle von -200 mV auf etwa -105 mV depolarisiert. Mit Hilfe von Strompulsen und gleichzeitiger Messung der Spannungsantwort wurden durch Anwendung der Ein-Elektroden- Methode relative Widerstandänderungen an den Membranen registriert. Der Strom war so gewählt, daß die Elektrodeneigenschaften linear blieben und die Membran nicht belastet wurde (Input-Strom: 1E-10 A). Die Widerstandsänderungen wurden dann der Membran zugeschrieben, wenn nach dem Auswaschen des CCCP mit Kontrollmedium die alte Spannungsantwort auf den konstant bleibenden Strompuls wieder erreicht wurde. 1E-5 M CCCP bewirkt eine Erniedrigung des Membranwiderstands auf 70 % des Kontrollwerts.

2.1.4. Strom/Spannungs-Kennlinie des Plasmalemmas.

Mit konventioneller Methode - zwei voneinander unabhängige Mikropipetten, eine als stromliefernde Elektrode, die andere zur Potentialmessung - gelang einmal eine Aufnahme der I/U-Kennlinie über das Plasmalemma. Fig. 9. zeigt die Membrancharakteristik. Im Vergleich zu Aufnahmen von FELLE (FELLE und BENTRUP 1976; BENTRUP 1980) ist die Leitfähigkeit im linearen Bereich etwa fünfmal so groß wie über Plasmalemma und Tonoplast in Serie.

2.2. Effluxversuche zur CCCP- und Temperaturabhängigkeit der Membranen Plasmalemma und Tonoplast.

2.2.1. Ionengehalt der Zellkompartimente Cytoplasma und Vakuole in Abhängigkeit von Temperatur und CCCP-Konzentration im Außenmedium.

Da die Gewebeproben sich während des Versuchs im Gleichgewichtszustand befinden (nach Einsetzen in die Effluxapparatur werden sie mindestens 1.5 Stunden an die Versuchsbedingungen äquilibriert), ist damit zu rechnen,daß die Membranen ein Ruhepotential eingestellt haben und kein Nettostrom von Ladungen vorliegt. Die radioaktive Spezifität der Kompartimente Cytoplasma und Vakuole wird als identisch mit der des Inkubationsmediums angenommen, da die Inkubationszeiten zur Sicherheit über den Zeitraum einer Aufnahmesättigung ausgedehnt wurden. Indem man den Aktivitätsgehalt der Kompartimente miteinander vergleicht, kann geprüft werden, ob der Ionenhaushalt von den Kontrollen abweicht. Dies ist im Hinblick auf aktiven Transport bedeutend, dementsprechend nicht nur eine Umladung des primär aktiv translozierten Ions die Folge wäre, sondern der Einbau eines Ionophors in die Membran auch die Umladung von sekundär aktiv transportierten Teilchen nach sich ziehen könnte. Für die Wirkung auf nicht an die elektrogene Pumpe gekoppelten passiven Ionentransport sollte man annehmen, daß lediglich die elektromotorische Kraft EMK(j) auf solche Ladungsträger j wirken sollte: EMK(j) = E(m) - E(j); dies hätte keine Umladung zur Folge.

Der Aktivitätsgehalt zum Effluxbeginn wird für die Kompartimente Cytoplasma und Vakuole als I(c) und I(v) definiert. Um nicht die Absolutwerte zum Vergleich korrigieren zu müssen wird mit den Verhältnissen I(v)/I(c) operiert, dies ist hinreichend und anschaulich darzustellen. Von der Kontrolle ausgehend: I(v)/I(c) (contr) werden Verhältnisse mit anderem Parameter, im vorliegenden Fall den CCCP-Konzentrationen und Temperaturen, I(v)/I(c) (param), verglichen. Treten keine Umladungen auf, so stehen die Aktivitätsgehalte der Kompartimente immer im gleichen Verhältnis:

$$I(v)/I(c)\ (contr) = I(v)/I(c)\ (param).$$

Bei Abweichung muß ein Koeffizient eingeführt werden, der ein Maß der Verschiebung ist; hier soll α zeigen, mit welchem Faktor zugunsten eines Kompartiments Konzentrationsänderungen in Cytoplasma und Vakuole stattgefunden haben. Ist α größer als 1, so bedeutet dies eine Verschiebung von Teilchen in die Vakuole, für Werte $\alpha < 1$ hat sich eine Konzentrationsänderung zugunsten des Cytoplasmas ereignet:

$$I(v)/I(c)\ (contr) = 1/\alpha\ I(v)/I(c)\ (param).$$

In Fig. 11. und 12. sind die Koeffizienten als Funktion der Temperatur bzw. CCCP-Konzentration im Medium für K/Rb und Cl dargestellt. Für K/Rb kann folgende Aussage getroffen werden:

Bei allen CCCP-Konzentrationen liegt α dicht bei 1 mit Ausnahme der 288 und 298 K Werte. Bei 288 K liegt

unter CCCP-Einwirkung eine Konzentrationserhöhung in der Vakuole um den Faktor 5 gegenüber dem Cytoplasma vor, bei 298 K um den Faktor 10. Bei höchster CCCP-Konzentration entfällt der 288 K Effekt.

Bezüglich des Cl verhalten sich die Membranen anders: Unter Einwirkung jeder CCCP-Konzentration erfährt das Cytoplasma eine Konzentrationserhöhung, auch hier treten Faktoren von 5 bis 10 auf. Ausnahmen sind α-Werte bei 283 K für geringe CCCP-Konzentration, 293 K für 1E-5 M CCCP.

2.2.2. Temperaturabhängigkeit und Einfluß verschiedener CCCP- Konzentrationen auf die Transportraten von K/Rb und Cl der Membranen Plasmalemma und Tonoplast.

Die Charakteristika der Effluxkinetiken sind deren Geschwindigkeitskonstanten k, die Raten, mit denen Teilchen über die Membran transportiert werden. Da die Flüsse direkt proportional sind, können auch die membranspezifischen Geschwindigkeitskonstanten verglichen werden, ohne absolute Größen berechnen zu müssen. Soll nur der Einfluß eines Parameters bezogen werden auf Kontrollbedingungen, ist diese Betrachtungsweise hinreichend. Ihr Vorteil liegt in der unmittelbaren Zugänglichkeit aus der graphischen Darstellung der Kinetik.

Fig. 10. zeigt die Effluxkinetik eines Mehr-Kompartiment-Systems, aufgenommen sind nur zwei Komponenten, die dritte und vierte, zu denen der schnelle Zellwand-Efflux und die Küvetten-Charakteristik gezählt werden, fehlen in der Darstellung.

Durch Extrapolation der spät auftretenden linearen Komponente und Subtraktion dieses Anteils von der Gesamtkinetik erhält man die schnelle frühe Komponente, die in halblogarithmischer Auftragung zur Geraden wird (Inset). Mit Hilfe eines solchen split-Verfahrens können die Kinetiken aller auftretenden Komponenten bestimmt werde, wenn die Meßintervalle hinreichende Auflösung bieten.

Um die Transportcharakteristika der Membranen für das jeweilige Ion unter verschiedenen Versuchsbedingungen gut miteinander vergleichen zu können, wurden den Einzelanalysen jeweils die Geschwindigkeitskonstanten entnommen und für die Komponenten Cytoplasma und Vakuole (bzw. Plasmalemma und Tonoplast) in einer Modellfunktion angewendet. Für den Aktivitätsgehalt der beiden Kompartimente zur Zeit t=0 wurde je eine Normgröße eingesetzt. Der Vorteil dieser Darstellung liegt darin, daß die aktuelle Kinetik der betrachteten Komponente unverfälscht und übersichtlich in ihrer Parameterfunktion wiedergegeben wird.

Fig. 13. A,B zeigt Cl-Effluxkinetiken mit verschiedenen CCCP-Konzentrationen als Parameter bei Temperaturen von 278 und 298 K; zur übersichtlichen Darstellung sind die Ordinaten geschachtelt. Fig. 14. - 17. zeigen die Efflux-Charakteristika der K/Rb- und Cl-Experimente in normierter Darstellung für Vakuole und Cytoplasma.

Der K/Rb-Transport über Plasmalemma und Tonoplast zeigt ein einheitliches Bild im Temperaturgang. CCCP in allen angewendeten Konzentrationen übt keinen nennenswerten Einfluß auf die Transportraten sowohl des Plasmalemmas als auch des Tonoplasten aus.

Im Gegensatz zu K/Rb ist der Cl-Transport deutlich temperaturabhängig, andererseits übt CCCP signifikant Einfluß aus. Die Wechselwirkung der CCCP-Moleküle mit den Membranen im Temperaturgang ist zu unübersichtlich, um eine Tendenz daraus zu interpretieren. Hier sollte der Temperaturgang in 2-Grad Intervallen durchgeführt werden.

2.2.3. Graphische Bestimmung der Aktivierungsenergie für den Transport von Ionen über Plasmalemma und Tonoplast, Vergleich von K/Rb mit Cl.

Arrhenius stellte eine empirische Gleichung auf, die den Zusammenhang zwischen der Temperatur T und der Geschwindigkeitskonstanten k eines katalysierten Umsatzes in einer chemischen Reaktion herstellt. Der Transport

eines Teilchens über die Membran kann als chemische Reaktion angesehen werden, in der Substrat und Produkt dem betrachteten Molekül vor und nach der Translokation über eine Membran entsprechen, dem carrier-Molekül wird eine Katalysator-Funktion zugeschrieben. Die Aktivierungsenergie für den Transport E(a) kann der Gleichung

$$k = A \exp(-E(a)/RT)$$

entnommen werden aus der logarithmischen Auftragung

$$\ln k = fn(1/T) .$$

In dieser Darstellung ist die Steigung der Kurve -E(a)/R. Multiplikation dieses Terms mit der Gaskonstante R (=8.3154 J/mol Grad) ergibt -E(a) mit der Dimension J/mol. Solch eine Bestimmung kann durchgeführt werden, wenn die graphische Darstellung über einen gewissen Bereich linear verläuft, d.h. die Natur des reaktionkatalysierenden Proteins nicht verändert wird. In Bereichen von Unstetigkeiten ist Vorsicht geboten.

In Fig. 18. sind die Arrhenius-Funktionen für K/Rb- und Cl-Transport graphisch dargestellt, um Aktivierungsenergien der Transportsysteme zu bestimmen. Während der K/Rb-Transport von CCCP offensichtlich wenig beeinflußt wird und die Streuung der Meßdaten gering ist, kommen für den Cl-Transport große Unstetigkeiten zum Vorschein. Zum einen wirkt CCCP deutlich, der Entkoppler sorgt für eine breite Streuung der Meßpunkte,

besonders in der Tonoplasten-Graphik, damit verglichen ist der CCCP-Einfluß am Plasmalemma gering; die CCCP-abhängige Divergenz der Transportraten ist etwa gleichgroß wie für K/Rb;zum anderen ist der Temperatureffekt verschieden gegenüber dem K/Rb-Transportsystem. Für die K/Rb-Kurven ist man geneigt, eine Gerade den Meßpunkten anzupassen; in der Cl-Darstellung nimmt eine Verbindungslinie zwischen den pro Temperatur gemittelten (!) Meßpunkten die Form eines 'M' an. Zwei Punkte liegen im Minimum: Die Werte für 278 und 288 K.

Die Aktivierungsenergie zum K/Rb-Transport beträgt am Plasmalemma ca. 10 kJ/mol für den Temperaturbereich 283 - 298 K, bzw. 30 kJ/mol zwischen 278 und 283 K. Am Tonoplasten besteht offenbar Linearität zwischen 278 und 293 K, während ab 293 K eine Unstetigkeit auftritt; die Aktivierungsenergie beträgt hier auch etwa 30 kJ/mol.

Wagt man trotz vorliegender Unstetigkeit für die Cl-Daten am Tonoplasten eine Geradenanpassung, so würde die berechnete Aktivierungsenergie im Temperaturbereich 278 bis 283 K ca. 350 kJ/mol, zwischen 283 und 293 K etwa 33 kJ/mol betragen.

3. Einfluß der Ca-Konzentration im Außenmedium.

3.1. Elektrophysiologische Versuche.

3.1.1. Einfluß auf das Membranpotential von Thalluszellen.

In Fig. 19. sind die Wirkungen von verschiedenen Ca-Konzentrationen auf das Membranpotential von Thalluszellen gezeigt.

Bei Vorinkubation in 1E-4 M Ca geben die Zellen auf eine Änderung des Ca-Gehalts im Außenmedium nur geringe Antwort: Erhöhung auf die 10-fache Konzentration führt zu ca. 25 mV Depolarisation, Erniedrigung auf 1/100 des Gehalts zieht nach einem schnellen hyperpolarisierenden transient eine Depolarisierung gleicher Amplitude wie die hone Konzentration nach sich. Zellen, die in Medium mit geringem Ca-Gehalt äquilibriert wurden, antworten deutlicher auf Ca-Änderungen in den Testlösungen. Fünf- und zehnfache Konzentrationserhöhung haben eine Depolarisierung um 50 mV bis zum Diffusionspotential zur Folge. Die an Ca 50-fach konzentrierte Testlösung bewirkt jedoch eine Hyperpolarisierung um fast 50 mV. Derselbe Versuch wurde mit Pflanzen durchgeführt, die mit einem um o.5 nöheren pH, pH 6, äquilibriert waren. Das Membranpotential nimmt im Kontrollmedium einen um 50 mV negativeren Wert an, gegenüber -160 mV im pH 5.5 Medium jetzt -215 mV. Die Amplitude der Depolarisation nach

Ca-Zufuhr ist für 10-fache Erhöhung gleich wie im pH 5.5 Medium, die Antwort auf 5-fache Ca-Erhöhung ist schon deutlich niedriger, während 1E-4 M Ca fast keine Änderung bewirkt. Wird das pH des Inkubationsmediums um weitere o.5 Einheiten erhöht, so treten wieder bei Testlösungen mit 1E-5 und 2E-5 M Ca starke Depolarisierungen um etwa 100 mV (von -210 mV auf das Diffusionspotential) auf.

Sollte Ca eine Wirkung die von FELLE (1974) postulierte H-Pumpe an der Plasmamembran haben, so ist unter der geringen Ca-Konzentration von 2E-6 M Ca ein anderes Verhalten des Membranpotentials als bei 1E-4 M Ca, der Kontrollbedingung aller bisherigen Experimente, zu erwarten. In der Tat verursachen pH-Änderungen im Außenmedium starke hyperpolarisierende transients von ca. 40 bis 60 mV, nach denen jedoch der Kontrollwert wieder erreicht wird (vgl. Fig. 20.).

Ein ähnliches Phänomen tritt mit schwächerer Wirkung bei Applikation verschiedener K-Konzentrationen auf. Während pH-Variationen Potentialänderungen bewirken, die ihre Richtung - depolarisierend oder hyperpolarisierend - entsprechend dem pH des Äquilibriermediums einstellen - Erniedrigung führt zu Depolarisierungen, Erhöhung folgen Hyperpolarisierungen - ist die Kaliumwirkung die Richtung betreffend unspezifisch (Fig. 21.).

3.1.2. Einfluß auf das Membranpotential von Rhizoidzellen.

Die Membran der Rhizoide (Plasmalemma und Tonoplast in Serie) antwortet in allen Fällen mit Hyperpolarisierungen, wenn in 1E-6 M Ca vorinkubiertes Gewebe mit höheren Ca-Konzentrationen versorgt wurde. Fig. 22. faßt die transient-Antworten und stationären Endwerte des Membranpotentials zusammen.

3.1.3. Widerstandsänderung der Membran nach Ca-Zufuhr.

Fig. 23. zeigt die mit einer Hyperpolarisierung der Rhizoidmembran einhergehende Widerstandserhöhung der Membran von etwa o.o8 auf o.14 (transient), später o.11 Ohm m^2 (Gleichgewicht). Dies entspricht einer Änderung von 75 bzw. 40 % des Kontrollwerts.

3.1.4. Strom/Spannungs-Kennlinien der Rhizoidmembran nach Änderung der Ca-Konzentration.

Von verschieden vorinkubierten Gewebeproben wurden mit Hilfe zweier unabhängiger intrazellulärer Elektroden und der Konstantstrom-Methode I/U-Kennlinien aufgenommen. Nach einer Bestimmung im Kontrollmedium wurde die Ca-Konzentration außen erhöht oder verringert und nach Einstellung eines konstanten Membranpotentials eine neue I/U- Kennlinie gemessen. An verschiedenen Zellen

wurde in mehreren Zyklen experimentiert, wobei jeder Zyklus aus einer Messung im Kontroll- und in der Testlösung bestand. Die Ergebnisse sind in den Fig. 24. abgebildet.

Aus den Darstellungen ist ersichtlich, daß die neuen, durch Ca-Änderung hervorgerufenen steady state Membranpotentiale vom Kontrollwert abweichen, ganz gleich, in welcher Ca-Konzentration äquilibriert worden war; die Steigungen im linearen Bereich unterscheiden sich nur wenig. Bei geringster und auch höchster Ca-Konzentration im Außenmedium wird die Kennlinie im linearen Bereich etwas steiler.

3.2. Ca- und K/Rb-Efflux.

3.2.1. Ca-abhängiger Efflux von K/Rb und Ca.

Da im elektrophysiologischen Experiment allein nicht geklärt werden kann, welches Ion eine Verschiebung des Membranpotentials verursacht, sollten Flußmessungen mit verschiedener Ca-Konzentration im Außenmedium als Parameter Hinweise geben.

Während die Transportraten von K/Rb über das Plasmalemma nicht verändert werden durch Variation der Ca-Konzentration außen, zeigt der Tonoplast ein Optimumverhalten. Hohe und geringe Konzentrationen (1E-3, 1E-6, Ca-frei+1E-6 M EGTA) von Ca außen verursachen nur

kleine K/Rb-Flüsse, die größte Rate wird durch 1E-4 M Ca erreicht.

Die Ca-Flüsse hingegen werden durch Transportraten bestimmt, die sowohl für Plasmalemma als auch den Tonoplasten ein Maximum bei höchster Ca-Konzentration besitzen; bei geringer Ca-Versorgung nähern sich die Geschwindigkeitskonstanten einem gemeinsamen Wert. Die Fig. 25. und 26. geben die Verhältnisse in normierter Darstellungsweise wieder. Offensichtlich ist das K-Ion nicht an den auftretenden Hyper- oder Depolarisationen durch Ca-Zufuhr oder -Entzug beteiligt, mit Ausnahme eventuell des Wechsels von 1E-4 M Ca auf geringere oder höhere Konzentrationen. Der Ca-Fluß sollte nur bei Anwendung der 1 mM Testlösung erhöht sein.

3.2.2. Verhältnis des Ionengehalts von Vakuole und Cytoplasma.

Für die verschiedenen Ca-Konzentrationen wurde keine Verschiebung der α-Werte (vgl. 2.2.1.) festgestellt. Sowohl K/Rb als Ca wahrten ihr Niveau in den Kompartimenten; eine Ausnahme bildete wieder das Verhältnis der Ca-Werte bei 1E-3 M Ca außen: Hier wurde eine Erniedrigung I(v)/I(c) auf 1/10 registriert, d.h. Ca ist offensichtlich im Cytoplasma angereichert worden.

Diskussion.

4.1. Allgemeines zum Membrantransport.

In einem Übersichtsartikel formuliert BENTRUP (BENTRUP, 1978) eine Nomenklatur der Transportsysteme über pflanzliche Zellmembranen. Die drei wichtigsten Mechanismen werden definiert als

1) passiver Transport, d.h. Diffusion eines Teilchens über die Membran auf Grund eines elektrochemischen Gefälles ohne Inanspruchnahme freier Energie aus metabolischem Substratumsatz; es ist zu unterscheiden:
a) unmittelbar durch die lipophile Phase stattfindende Diffusion, die von Temperaturänderungen weitgehend unabhängig ist; b) durch ein integrales Protein carrier) erleichterte Diffusion;

2) primär aktiver Transport: Eine Stoffwechselenergie verbrauchende Pumpe transportiert Ionen; in allen bekannten Fällen stammt die aufgewendete Energie zum Transport über Plasmamembranen aus der ATP-Hydrolyse. Thermodynamisch ist die Richtung des aktiven Transports bergauf, gegen einen Konzentrationsgradienten; dieser Ladungstransport erzeugt eine Potentialdifferenz, ist elektrogen;

3) an den primär aktiven Transport kann die Translokation eines anderen Ions gekoppelt sein, z.B. unter

elektrisch neutralen Bedingungen im Falle eines Antiports gleicher Ladungen, aber auch als ein elektrisch in Erscheinung tretender Netto-Strom, wenn die Stöchiometrie eines solchen sekundär aktiven Transports vom Verhältnis 1:1 abweicht.

Alle Transportsysteme sind abhängig vom Gradienten des elektrochemischen Potentials über die untersuchte Membran.

4.2. Evidenz einer elektrogenen Pumpe bei Riccia fluitans.

FELLE und BENTRUP (1976) zeigen, daß die aktuellen Membranpotentiale bei Riccia fluitans höchste zu berechnende Diffusionspotentiale, gemäß der Goldman-Gleichung, übersteigen. Die Annahme einer H-Pumpe wird unterstützt durch Beobachtungen der im Licht höheren Sensibilität der Plasmamembran auf Änderungen vom pH im Außenmedium gegenüber Änderung der K-Konzentration; diese Beobachtung machten auch GYENES et al. (1978). Im Dunkel ist das Membranpotential reduziert auf das Diffusionspotential; hier herrscht der Kalium-Einfluß auf das elektrische Membranverhalten vor.

Die Aufnahme von Strom/Spannungs-Kennlinien der Rhizoidzelle unter Kontrollbedingungen als auch nach Vergiftung oder Entkopplung möglicher Pumpen erlauben, mit

Hilfe einer Subtraktion der diffusiven Komponente (entkoppelter oder vergifteter Zustand) von der Summe aller Komponenten, die eine integre Membran bietet (Kontrollbedingungen), die Kennlinie eines Pumpenanteils zu eruieren (SLAYMAN und GRADMANN, 1975 ; GRADMANN, 1975; GRADMANN et al., 1978; BENTRUP, 1980). Diese Prozedur lehnt sich an ein vereinfachtes Ersatzschaltbild, das die Parallelität der passiven und aktiven Transportwege unterstellt (FINKELSTEIN, 1964; s. Fig. 27.A).

Bei Riccia resultiert eine Pumpenspannung E(p) von ca. -360 mV. Die Triebkraft für Protonen (proton motive force, pmf) wird wiedergegeben durch die Gleichung

$$pmf = E(m) - E(H) = E(m) - RT/F \ln (H(a)/H(i)).$$

Für pH-Gleichheit des Außenmediums mit dem Cytoplasma (pH 7) existiert immer noch eine zelleinwärts gerichtete Triebkraft für Protonen von ca. -250 mV. Ist die Abschätzung des vakuolären pH auf 3 richtig (LÜHRING, 1976), so resultiert eine ins Cytoplasma gerichtete proton motive force von etwa -240 mV. Bei Fehlen einer H-Pumpe und gleichzeitiger guter Permeabilität der Membranen für Protonen wäre die pmf ausreichend, um das cytoplasmatische pH um mindestens drei Einheiten zu senken. Dies legt das Vorhandensein eines aktiven H-Transportes nahe.

Bei Einsatz eines Entkopplers, wie z.B. CCCP, der die Membran permeabel für Protonen machen und hohe

Leckströme induzieren sollte (LEBLANC, 1971; DENESH et al., 1977; FELLE und BENTRUP, 1977), ist eine starke elektrische Antwort am Plasmalemma und Tonoplast zu erwarten.

Das Augenmerk richtet sich insbesondere auf den Tonoplasten: Im Fall einer hohen Pumpendichte am Tonoplasten, die einen starken H-Gradienten aufrecht erhalten muß, sollte die Potentialdifferenz über diese Membran in Richtung des H-Gleichgewichtpotentials verschoben werden (E(H) = -150 mV).

4.3. Wirkung von CCCP auf das elektrische Verhalten der Riccia-Membranen.

Die Potentialdifferenzen über beide Membranen werden stark erniedrigt nach CCCP-Zufuhr. Dabei herrscht am Plasmalemma das Diffusionspotential, auch der Tonoplast wird depolarisiert, nimmt sogar negative Spannungswerte an (Vakuole gegen Cytoplasma). Da bei pH(außen) 5.5 und auch 7 oder 7.5 eine Depolarisierung des Tonoplasten eintritt, E(to) sich also in Richtung des H-Gleichgewichtpotentials verschiebt, ist eine Erhöhung der Protonenleitfähigkeit beider Membranen anzunehmen. Das Ausmaß der Potentialänderung nähert sich nur schlecht den Erwartungen an, daher muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß 1. die Protonenpumpe weiterarbeitet und nur vorübergehend durch CCCP- Einbau in die Membran beeinflußt wird, 2. ein Gegentransport gleicher Ladungen, wie z.B. Kaliumionen, induziert wird, oder der Symport von Anionen gekoppelt ist. Daß hier nicht ausschließlich Pumpenhemmung durch den Entkoppler (vgl. KIKUYAMA et al., 1979; KEIFER and SPANSWICK, 1979) vorliegt, ist aus Fig. 7. ersichtlich, die zeigt,daß der Membranwiderstand deutlich durch CCCP erniedrigt wird und nach Auswaschen mit Kontrollmedium steigt, ohne daß das Membranpotential schon repolarisiert. Die elektromotorische Kraft für die in Betracht kommenden Ionen K,Cl und H sind von der Vakuole ins Cytoplasma gerichtet; dies ergibt sich aus Konzentrationsbestimmungen für die intrazellulären

partimente durch FELLE (1974) und der gemessenen Potentialdifferenz über dem Tonoplasten. Hieraus kommen an Protonen gekoppelte K- aber auch Cl-Translokationen, induziert durch CCCP-Wirkung, in Frage. Unwahrscheinlich ist die K-Beteiligung, da eine Depolarisation mindestens auf E(H) zu erwarten ist; vielmehr sollte Cl beteiligt sein.

Aus dem Verhalten der CCCP-induzierten Widerstandsabnahme (Fig. 8.), bei der eine Schulter in der Kinetik in der Höhe von ca. -150 mV auftritt, könnte gedeutet werden als Erreichen eines Niveaus, an dem die passive Leitfähigkeit ein steady state, am Diffusionspotential des Tonoplasten, erreicht. Dies stützt die Annahme der Protonophorwirkung von CCCP.

4.4. I/U-Kennlinie des Plasmalemma.

Die Aufnahme der Plasmalemma-Kennlinie zeigt einen linearen Verlauf im Bereich -260 bis -100 mV. Die etwa fünfmal höhere Leitfähigkeit gegenüber Messungen von Tonoplast und Plasmalemma in Serie läßt auf einen Tonoplasten-Widerstand von ca. 1.2 bis 1.4 Ohm m^2 gegenüber o.3 bis o.4 Ohm m^2 Plasmalemma-Widerstand schließen (Abschätzung aus der Annahme, daß der applizierte Strom über die cytoplasmatische Kappe abfließt). An Avena Koleoptilen wurden gleiche Verhältnisse von GOLDSMITH and CLELAND (1978) bestimmt. In dieser Arbeit wurden nur die Eingangswiderstände gemessen, die Geometrie der Zelle ist nicht berücksichtigt und dem physiologischen Zustand des Objekts nach der Präparation (Zentrifugation) wird nicht Rechnung getragen.

4.5. Einfluß von CCCP auf die K/Rb- und Cl-Transportraten der Membranen.

Nach MERCIER und POOLE (1980), PENNY und BOWLING (1975) und RYBOVA et al. (1972) ist an Hydrodictyon, Beta vulgaris und Elodea densa eine Kopplung der K/Rb-Flüsse an die Protonentranslokation vorhanden, es wird aktiver K/Rb-Transport diskutiert, der durch CCCP inhibiert werden kann. FELLE und BENTRUP (1976) fanden an Riccia fluitans Beeinflussung des K/Rb-Transports durch Licht/Dunkel-Wechsel, jedoch geringe Wirkung auf Cl-Flüsse. Hier wird angenommen, daß durch mit der Photostimulierung der Protonenpumpe einhergehende Hyperpolarisation der Plasmamembran die EMK für passiven K/Rb-Transport erhöht wurde. Cl-Transport war durch Licht nur schwach beeinflußt. Da Licht/Dunkel-Wechsel mit vakuolären pH-Änderungen stark korrelieren, ist damit die für elektrische Phänomene plausible Erklärung eines an H-Bewegungen gebundenen Cl-Transports wieder in die Ferne gerückt. Jedoch belehren uns die Änderungen der Cl-Transportraten unter CCCP-Einfluß eines anderen.

Die Kinetiken der radioaktiven tracer-Abgabe unter CCCP- und Temperatur-Einfluß variieren für Cl deutlich, während der K/Rb-Kanal offensichtlich nicht vom Entkoppler berührt wird (vgl. Fig. 14. bis 17.). Es besteht damit durchaus die Möglichkeit einer Anbindung der Cl-Flüsse an die Protonenverschiebung. Das Vorhandensein einer durch CCCP hemmbaren Cl-Pumpe kann

jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die Temperaturabhängigkeit gestattet im Arrhenius-Plot - wenn auch unter Vorbehalt eines unstetigen Kurvenverlaufs - die Aktivierungsenergien zu berechnen. Während für K/Rb nur eine Änderung von 10 auf 30 kJ/mol beim Sprung von Zimmertemperatur auf 278 K eintritt, erfährt die Aktivierungsenergie für den Cl-Transport immerhin einen Zuwachs um mindestens 300 kJ/mol. Dies spricht für eine carrier-vermittelte Diffusion (schwache Bindung) des K/Rb über die Plasmamembran, während zum Cl-Transport auf Beteiligung einer energiereichen (kovalenten) Bindung geschlossen werden darf (vgl.HOPE and ASCHBERGER, 1970). Weiterhin ist durch die Ergebnisse der Flußmessungen gezeigt, daß K/Rb - nicht hemmbar durch CCCP - und Cl verschiedene Transportwege über die Membranen, sowohl Plasmalemma als auch Tonoplast, benutzen. Damit existieren m.E. genügend Indizien, um eine Verknüpfung des Cl-Transports mit einem metabolisch energetisierten System anzunehmen. Es ist noch nicht klar, ob eigens für Cl eine elektrogene Pumpe vorhanden ist, wie sie in Acetabularia, Codium oder Hydrodictyon diskutiert wird (GRADMANN, 1973; GRADMANN and MUMMERT, 1980; MUMMERT, 1979; BISSON und GUTKNECHT, 1977; RAVEN und GLIDEWELL, 1975), oder ein an die elektrogene H-Pumpe gekoppelter, also sekundär aktiver, Transport aktuell ist. In diesem Fall ist die Kontrolle der Translokation nicht nur vom H-Gradienten über die Plasmamembran, sondern insbesondere über den Tonoplasten in Betracht zu ziehen. Um Einblick in solch ein Kontrollsystem zu erhalten und Quantitäten zu

registrieren, sollte der methodische Aufwand größere Maße annehmen, wie z.B. simultane Anwendung von ionensensitiven Elektroden in den Kompartimenten Cytoplasma und Vakuole, da nicht die Innenseite der Riccia Plasmamembran wie bei großen Zellen mit Hilfe der Perfusions-Technik (vgl. KAWAMURAet al., 1980; KIKUYAMA et al., 1979; FUJII et al., 1979; SHIMMEN and TAZAWA, 1977) mit Medium bekannter Zusammensetzung kontrolliert werden kann. SANDERS (1980a, 1980b) hat an Chara corallina mit der Perfusions-Technik gezeigt, daß der Cl-Transport vom intrazellulären Cl- und H-Gehalt gesteuert wird, abhängig ist von Licht/Dunkel-Bedingungen und mehr als einen Transportmechanismus nutzt. Auch SMITH (1972), SMITH und WALKER (1976), BEILBY und WALKER (1981) lieferten Daten, die die Annahme einer Kopplung Cl/H-Transport nahelegen.

4.6. Einfluß von Ca auf das Membranpotential.

Die Antwort des Membranpotentials auf Ca-Änderungen ist abhängig von der Vorinkubation; in 1E-4 M Ca äquilibriertes Gewebe zeigt nicht so starke Reaktionen, wie Pflanzen, die in 1E-6 M Ca oder 2E-6 M Ca vorinkubiert wurden. An Tnalluszellen führte sowohl Erhöhung als auch Senkung des Ca-Spiegels in der Testlösung zur Depolarisation. Die Potentialänderung in Richtung Diffusionspotential war um so ausgeprägter, je höher das im Außenmedium gebotene pH war. Da eine Depolarisierung von einem Nettoeinstrom verursacht wird, erhebt sich die Frage nach dem verantwortlichen Mechanismus:

Ist die Ca-Permeabilität der Membran gesteigert, dies würde eine Zunahme des Ca-Influx bedeuten, wird die passive Leitfähigkeit für einen anderen Kationen-Influx - H oder K - (äquivalent Anionen-Efflux) erhöht oder ein passiver Kationen-Efflux durch Neutralisierung negativer Festladungen an der Membran behindert, oder immobilisiert Ca die Protonen-Pumpe? Experimente zur Abhängigkeit des Membranpotentials vom pH und der K-Konzentration im Außenmedium bei geringer Ca-Molarität führten zu dem Ergebnis, daß auf pH-Änderungen transients mit einer relativ hohen Amplitude von etwa 50 mV auftraten, die Antwort auf verschiedene K-Konzentrationen jedoch nicht signifikant waren (Fig. 20. und 21.).Dies kann nicht damit erklärt sein, daß die Zellwand als guter Ionenaustauscher Protonen absorbiert und zur gemessenen Potentialdifferenz

beiträgt, denn so müßte eine Depolarisation bei H-Zufuhr registriert werden. Wegen fehlender und nicht möglicher Widerstandsmessungen an Thalluszellen ist hier keine Aussage über den verantwortlichen Mechanismus möglich.

Potentialmessungen am Rhizoid ergaben bei Erhöhung des Ca-Niveaus den gegenteiligen Effekt. Die Änderung im Außenmedium war immer verbunden mit einer Hyperpolarisation, wobei transients das Membranpotential bis auf -330 mV hoben (Fig. 22.). Eindeutig ist hier die Dominanz der elektrogenen Pumpe, weil das negative Diffusionspotential, nämlich von K, -205 mV nicht überschreitet.

4.7. Membranwiderstand und I/U-Kennlinie am Rhizoid.

Bei der Ca-induzierten Hyperpolarisation der Rhizoidmembran steigt der Widerstand während des transients von 8E-2 auf 14E-2 Ohm m^2 an (Fig. 23). Geht man davon aus, daß der Widerstand R(p) der elektrogenen Pumpe in der gleichen Größenordnung wie der Diffusionswiderstand R(d) liegt, so ist die hohe Pumpenspannung für den potentialbestimmenden Strom ausschlaggebend. Wird R(d) aber bedeutend kleiner als R(p), so sollte das Membranpotential dicht am Diffusionspotential liegen. Eine Widerstandszunahme von 75 % bei gleichzeitiger Hyperpolarisierung (Fig. 23.) ist durch eine Abnahme der passiven Leitfähigkeit und nicht eine Zunahme der Pumpenleitfähigkeit zu erklären.

Eine Möglichkeit wäre die Änderung in der H/ATP-Bilanz der elektrogenen Pumpe; würde die Stöchiometrie H/ATP von 2:1 - wie unter Kontrollbedingungen anzunehmen ist (FELLE und BENTRUP, 1976) - auf 1:1 geändert, so würde nach der Gleichung

$$E(p) = \triangle G/n\,F - E(H)$$

die elektrogene Pumpe ihr Gleichgewichtspotential bei etwa -430 mV finden (für pH(a) = pH(i) = 7); bei paritätischer Bestimmung des Membranpotentials durch die Widerstände R(d) und R(p) entstünde ein Ausschlag zugunsten der Pumpenspannung. An Fig. 27. A,B können die Deutungsversuche überschaubar diskutiert werden:

1. Einer Abnahme der passiven Leitfähigkeit folgt die Verschiebung des Membranpotentials zur EMK der Pumpe, deren Gleichgewichtspotential gut angenähert werden sollte. Mit zunehmender Hyperpolarisierung des Membranpotentials ist jedoch eine Abnahme des Membranwiderstands zu erwarten, da die Kennlinie der Pumpe zum Punkt E(p) abfällt.

2. Aus der Verschiebung der Pumpenkennlinie durch Änderung der Stöchiometrie H/ATP resultiert eine Zunahme des Pumpenstroms, d.h. das Membranpotential wird in Richtung EMK der Pumpe bewegt. Eine Verschiebung der Pumpenkennlinie in hyperpolarisierende Richtung hat gleichzeitig zur Folge, daß die Gesamtleitfähigkeit der Membran sinkt, denn der Wendepunkt der sigmoiden Kurve ist weit in den negativen Bereich gerückt. So dürfte

bei fortschreitender Hyperpolarisation ein Strom durch die passiven Transportwege - deren Widerstand als gleichbleibend angesehen wird - folgen, der das Membranpotential festhält, bevor E(p) erreicht werden kann.

Die im steady state aufgenommenen Strom/Spannungs-Kennlinien zeigen in ihrer Gestalt keine signifikante Änderung, d.h. die Gesamtleitfähigkeit wird durch Variation der Ca-Konzentration im Außenmedium nicht sonderlich beeinflußt. Wir finden auch hier lediglich eine Verschiebung des Membranpotentials. Dies Verhalten spricht weder für dauerhafte Ca-induzierte Beeinflussung der passiven Leitfähigkeiten, noch für die Wirkung auf die Mobilität des aktiven carriers.

4.8. Ca- und K/Rb-Efflux in Abhängigkeit von der externen Ca-Konzentration.

K/Rb-Flüsse sind offenbar nicht an der Entstehung der elektrischen transients beteiligt, im Vergleich der K/Rb-Transportraten über die Membranen zeigt der Tonoplast ein Optimum-Verhalten mit einem Maximum bei 1E-4 M Ca; das Plasmalemma reagiert nicht eindeutig.

Die Bestimmung der Ca-Geschwindigkeitskonstanten zeigt nur für die 1 mM Ca-Konzentration eine Steigerung der Transportraten; die Raten der Ca-Translokation im Bereich von Ca-freier (Testlösung ohne Ca, mit 1E-6 M EGTA) Testlösung bis zu 1E-4 M Ca zeigen keine Wirkung auf das Effluxverhalten.

Die Verhältnisse im Ionengehalt Vakuole:Cytoplasma für K/Rb und Ca bleiben konstant für alle Inkubationen.

Das Ergebnis aus ROBINSON's (1977) Untersuchung an Pelvetia, daß Ca-Mangel die Ca-Flüsse stimuliert, kann ebensowenig bestätigt werden wie der experimentelle Befund von ERDEI und ZSOLDOS (1977), daß die K-Flüsse von externen Ca-Konzentrationen berührt werden.

Die Schlußfolgerung für das Verhalten der Riccia Plasmamembran ist, daß weder Ca noch K/Rb noch eine Verschiebung der EMK's dieser Ionen zu einer Depolarisation der Thalluszellen beitragen.

Zusammenfassung.

Am thallosen Lebermoos Riccia fluitans wurden mit Hilfe elektrophysiologischer und radioaktiver tracer-Flußmessungen Untersuchungen zur Charakterisierung der Plasmamembran durchgeführt. Rhizoidzellen bieten die Möglichkeit, unter optischer Kontrolle den Tonoplasten und das Plasmalemma elektrisch zu diskriminieren.

1. CCCP wirkt als Entkoppler und Protonophor. Dies macht sich in Depolarisierungen der Membranen Plasmalemma und Tonoplast bemerkbar. Das Plasmalemma wird um mehr als 100 mV auf das Diffusionspotential von ca. -105 mV depolarisiert; der Tonoplast erreicht nicht das H-Gleichgewichtspotential von etwa - 140 mV, sondern in einem transient eine negative Potentialdifferenz von -10 bis -30 mV (Vakuole negativ), nach einem Kontrollwert von +50 bis +20 mV ohne CCCP.

Die Umpolarisierung des Tonoplasten erfolgt im Sinne einer H-Elektrode (Fig. 6.).

Die I/U-Kennlinie über dem Plasmalemma zeigt im linearen Bereich einen spezifischen Widerstand für die Membran von etwa 0.3 bis 0.4 Ohm m^2. Der von Felle gemessene Widerstand (FELLE und BENTRUP, 1976) ist etwa fünfmal so hoch; es wird auf einen spezifischen Widerstand des Tonoplasten von 1.2 bis 1.4 Ohm m^2 geschlossen.

2. Aus Temperaturgängen unter verschiedenen CCCP-Konzentrationen bei Efflux-Experimenten wurden die Transportraten (k(c,v), 1/sec) von K/Rb und Cl über die Plasmamembranen bestimmt. Bei Auswertung nach der empirischen Arrhenius-Gleichung stellt sich heraus, daß zur Translokation der untersuchten Ionen Aktivierungsenergien im Temperaturbereich 283 bis 298 K von 10 kJ/mol für K/Rb, von ca. 30 kJ/mol für Cl, im Temperaturbereich 278 bis 283 K von 30 kJ/mol für K/Rb und ca. 350 kJ/mol für Cl benötigt werden.

Durch Variation der Ca-Konzentration im Außenmedium zwischen '0' und 1E-3 mol/l werden K/Rb- und Ca-Transport nicht signifikant beeinflußt.

I/U-Kennlinien an Rhizoidzellen lassen für verschiedene Ca-Konzentrationen keine eindeutige Änderung im linearen Bereich erkennen.

Das Membranpotential wird durch unterschiedliche Ca-Konzentrationen verschoben; ein Optimumverhalten im Bereich 1E-5 bis 1E-4 M Ca der Testlösung liegt vor.

Widerstandsmessungen ergaben eine Zunahme des Membranwiderstandes von ca. 75 % bei gleichzeitiger Hyperpolarisation um -80 bis -100 mV.

Die Temperaturabhängigkeit der Transportraten über die Plasmamembran läßt auf ionenspezifischen Transport schließen; während aus der Aktivierungsenergie für K/Rb

eine erleichterte Diffusion über einen carrier anzunehmen ist, legen die stark temperaturabhängigen Raten für Cl-Austausch die metabolische Kontrolle dieses Transports nahe.

Ca besitzt wahrscheinlich auf mehrere Prozesse Einfluß (Optimumverhalten). Auf Grund einer Widerstandszunahme bei gleichzeitiger Hyperpolarisation der Plasmamembran wird diskutiert, daß Ca auf die Stöchiometrie der elektrogenen Pumpe wirkt.

Appendix 1. Küvetten-Kinetik

Sind von einer Zelle schnelle Reaktionen auf verschiedene Substratkonzentrationen im zugeführten Medium zu erwarten, so ist die Bedingung für fehlerfreie Messung, daß die Reaktionskinetik des Organismus nicht verzerrt wird durch einen langsamen Medienaustausch.

Die Kinetik der Meßküvette ist abhängig von ihrem Volumen V und der Fließgeschwindigkeit s. Der Vorgang entspricht einer Reaktionskinetik 1. Ordnung, wie im folgenden hergeleitet (vgl. Fig. 5.).

V	:=	Küvetten-Volumen	(l)
s	:=	Fließgeschwindigkeit des Mediums	(l/min)
c(i,t)	:=	Konzentration in der Küvette zur Zeit t	(mol/l)
c(i,o)	:=	vorherige, zu ersetzende Konzentration	(mol/l)
c(i,e)	:=	neue, gewünschte Konzentration	(mol/l)

Wird die Küvette mit V Liter Medium der Konzentration c(i) gefüllt, so beträgt die Zahl der Moleküle n im Reaktionsraum V

$n = V \; c(i).$

Die Anzahl der Moleküle, die in der Zeiteinheit zuströmen bzw. abfließen, ist:

1. $\frac{dc(i)}{dt} \; V \; ,$

2. $c(i) \; s \quad .$

Im stetigen Durchfluß und erfolgendem Medienwechsel

kann die Änderung beschrieben werden durch die aktuelle Konzentration c(i,t), die neue, gewünschte Konzentration c(i,e), das Volumen des Reaktionsraums V und die Fließgeschwindigkeit s.

$$V \frac{dc(i,t)}{dt} = c(i,e)\, s - c(i,t)\, s \quad ,$$

$$-\frac{s}{V} dt = \frac{dc(i,t)}{c(i,t) - c(i,e)}$$

Integration führt zu:

$$c(i,t) = c(i,o)\, e^{-st/V} + c(i,e)\,(1 - e^{-st/V}) \quad .$$

Sei c(i,o), die anfängliche Konzentration an i, gleich '0', dann ändert sich die Gleichung zu

$$c(i,t) = c(i,e)\,(1 - e^{-st/V}) \quad .$$

$100 \frac{c(i,t)}{c(i,e)}$ gibt an, wieviel % der gewünschten Konzentration c(i,e) nach der Zeit t im Reaktionsraum V erreicht sind.

Appendix 2. Aufnahme der Strom/Spannungs-Kennlinie.

Zur Messung des Membranwiderstands oder -stroms muß die Zellgeometrie berücksichtigt werden. Insbesondere bei langen, zylindrischen Zellen wird man in der Regel bei punktueller Strominjektion eine nichtlineare Potentialverteilung feststellen. Mit Hilfe der Theorie des linearen, unendlichen Kabels kann eine quantitative Beschreibung gegeben werden, jedoch sollten Experimente die Gültigkeit solcher Annahmen sicherstellen (Cole, 1968).

a) Strominjektion in die Mitte einer zylindrischen Zelle. Der Strompuls sollte so klein sein, daß die Linearität der I/U-Kennlinie gewahrt bleibt; die Länge der Zelle sei l, registriert wird die Spannungsantwort in der Entfernung x vom Injektionsort.

Definitionen:
- i(l) := intrazellulärer Längsstrom
- i(m) := auf die Längeneinheit bezogener Membranstrom
- U(o) := Spannungsantwort am Injektionsort 'O'
- U(x) := Spannungsantwort in der Entfernung x vom Ort der nung x vom Ort der Stromapplikation
- r(i) := intrazellulärer Widerstand pro Längeneinheit
- r(m) := auf die Längeneinheit bezogener Membranwiderstand
- I(o) := am Ort 'O' applizierter Strom (Input-Strom)

Den Längsstrom beschreibt folgende Funktion:

$$i(l) = -\frac{1}{r(i)} \frac{dU(x)}{dx} \quad . \qquad (1)$$

D.h. ein Teil des applizierten Stroms fließt über die Membran nach außen; die Abnahme des Stroms mit dem Weg ist abhängig vom Membranwiderstand:

$$\frac{di(l)}{dx} = -\frac{U(x)}{r(m)} = i(m) \qquad (2)$$

Es resultiert eine Potentialverteilung entlang der Zelle, die durch Kombination der beiden Gleichungen als Funktion der Widerstände r(i) und r(m) angegeben wird.

Aus Gleichung (1) wird:

$$\frac{di(l)}{dx} = -\frac{1}{r(i)} \frac{d^2 U(x)}{dx}$$

Kombination der Gl. (1) und (2):

$$U(x) = \frac{r(m)}{r(i)} \frac{d^2 U(x)}{dx} \qquad (3)$$

Die Lösung dieser Differentialgleichung lautet

$$U(x) = A\, e^{kx} + B\, e^{-kx}$$

Da nur die Abnahme der Spannungsantwort mit dem Weg physikalisch sinnvoll ist, ergibt sich

$$U(x) = B\, e^{-kx} .$$

B wird berechnet, indem $x = 0$ gesetzt wird:

$$B = U(o) .$$

Damit ist die Antwort des Membranpotentials auf einen Strompuls gegeben durch:

$$U(x) = U(o)\, e^{-kx} .$$

Zweimalige Ableitung dieser Gleichung führt zu

$$\frac{d^2 U(x)}{dx} = k^2 U(o)\, e^{-kx} = k^2 U(x) \quad .$$

Durch Koeffizientenvergleich mit Gl. (3) wird deutlich, daß

$$k^{-2} = \frac{r(m)}{r(i)} \quad ;$$

im allgemeinen wird der reziproke Wert von k als Längskonstante angegeben:

$$U(x) = U(o)\, e^{-x/\lambda} \quad . \qquad (4)$$

b)
Diese Potentialverteilung wird durch einen Strom in nur eine Richtung hervorgerufen. Da der Strom nach zwei Seiten abfließt, müssen Gl. (1) und (2) korrigiert werden:

$$i(1) = - \frac{2}{r(i)} \frac{dU(x)}{dx} \quad ; \qquad (1')$$

$$\frac{di(1)}{dx} = - 2\, i(m) \quad . \qquad (2')$$

Die Ableitung der Gl. (4) in (1') eingesetzt liefert:

$$i(1) = - \frac{2}{r(i)} \left(- \frac{1}{\lambda} U(o)\, e^{-x/\lambda}\right)$$

Der Längsstrom soll als der insgesamt fließende Strom definiert sein (Input-Strom):

$$I(o) = \frac{2}{\lambda r(i)} U(o)\, e^{-x/\lambda} \quad .$$

Wird die Spannungsantwort im Injektionsort abgeleitet, so erhält man:

$$I(o) = \frac{2\, U(o)}{\lambda r(i)} \quad , \text{ bzw. für } U(o)$$

$$U(o) = \frac{I(o)\, r(i)}{2} \lambda \quad . \qquad (5)$$

Am Ort x ist die Antwort

$$U(x) = \frac{I(o)\ r(i)}{2}\ \lambda\ e^{-x/\lambda} \quad . \qquad (6)$$

Division der beiden Gl. (5) und (6) durcheinander führt zu

$$e^{x/\lambda} = \frac{U(o)}{U(x)} \quad .$$

So erhält man bei konstantem Input-Strom die Längskonstante

$$\lambda = \frac{x}{\ln \frac{U(o)}{U(x)}} \quad .$$

Voraussetzung für diese Berechnung ist

$$1 > \lambda \quad .$$

c)
Der längenbezogene Membranstrom i(m) kann aus Gl. (1') und (2') berechnet werden, indem diese Funktionen explizit für die Differentiationsglieder dargestellt werden. Der Längsstrom i(1) wird als Input-Strom I(o) angegeben, da im Ort '0' abgeleitet wird. Division der Gleichungen durcheinander ergibt:

$$\frac{dI(o)}{dU(o)} = \frac{r(i)\ I(o)}{4\ i(m)} \quad , \text{ woraus folgt}$$

$$i(m) = \frac{r(i)\ I(o)}{4} \frac{dI(o)}{dU(o)} \quad .$$

Wird hier die für r(i) explizite Form aus Gl. 5 eingesetzt, so ergibt dies:

$$i(m) = \frac{U(o)}{2\lambda} \frac{dI(o)}{dU(o)} \quad .$$

Nun ist die Dimension von i(m) A/cm, der Membranstrom ist lediglich pro Längeneinheit berechnet;

dividiert man diesen Wert noch durch den Zellumfang, so führt dies zum spezifischen Membranstrom I(m):

$$I(m) = \frac{U(o)}{4 \pi r \lambda} \frac{dI(o)}{dU(o)} .$$

(nach COLE's Theorem)

Appendix 3. Einsatz von Doppelelektroden.

Die Anwendung der Doppelelektroden (double-barreled microelectrodes) besitzt nur bei kleinen Zellen für die Impedanzmessung Bedeutung. Prinzipiell liegt ein System von zwei Einzelelektroden vor, deren eine der Strominjektion, die andere der Spannungsableitung dient. Die Herstellung besteht in dem Zusammenschmelzen und Verdrillen zweier Kapillaren, die nach Erkalten gemeinsam zu Mikropipetten gezogen werden. Problematisch ist das Auftreten von Kopplungsphänomenen während der Stromapplikation: Es existieren ein Kopplungswiderstand und eine Kopplungskapazität. Nach Erreichen eines bestimmten maximalen Stroms wird die Kennlinie der Elektrodenspitze, durch die der Strom fließt, nicht-linear. Diese Eigenschaft beeinflußt bei Doppelelektroden besonders die parallele Spannungselektrode, so daß man nur ein Fenster aus dem I/U-Spektrum einsehen kann, das sonst mit zwei getrennten Mikroelektroden erfaßt wird. Bei Anwendung zur Impedanzmessung im linearen Bereich der Elektrodenkennlinie ist die double-barreled Methode jedoch gut geeignet, um bei Applikation eines konstanten Stroms Messungen an kleinen Zellen durchzuführen. In diesem Fall kann der Kopplungswiderstand R(c) kompensiert oder rückgerechnet werden, die Kopplungskapazität C(c) ist viel kleiner als die absolute Membrankapazität C(m) bei Zellen mit einem Durchmesser von ca. 20 µm (C(m) = 10 nF, C(c) = 20 pF).

Abgesehen von den Kopplungsgrößen können die Einzelelemente der double-barreled Elektroden gleich vereinfacht wie Einzelelektroden im Äquivalentkreis dargestellt werden (vgl. Fig. 4.b).

Literatur.

BEILBY,M.J., and N.A.WALKER (1981):
Chloride Transport in Chara.
J.Exp.Bot. 32, 43-54

BENTRUP,F.W. (1974):
Cell Electrophysiology and Membrane Transport.
Fortschr. Bot. 37, 64-77

BENTRUP,F.W. (1978):
Cell Electrophysiology and Membrane Transport.
Fortschr.Bot. 40, 84-98

BENTRUP,F.W. (1980):
Electrogenic Membrane Transport in Plants. A Review
Biophys.Struct.Mech. 6, 175-189

BISSON,M.A. and J.GUTKNECHT (1977):
Osmotic Regulation in the Marine Alga, Codium decorticatum.
II. Active Chloride Influx Exerts Negative Feedback Control on the Turgor Pressure
J.Membrane Biol. 37, 85-98

COLE,K.S. (1968):
Membranes, Ions and Impulses.
University of California Press

DENESH,M.,ANDRIANOV,V.K.,
BULYCHEV,A.A. and G.A.KURELLA (1977):
Action of the Uncoupler Carbonyl Cyanide Chloromethoxyphenylhydrazone on Membrane Potentials and pH Value of the Vacuolar Sap of Nitella Cells.
Transl. Fiziologiya Rastenii 24, 528-533

DUNLOP,J. (1976):
The Electrical Potential Difference across the Tonoplast of Root Cells.
J. Exp. Bot. 27, 908-915

ERDEI,L. and F.ZSOLDOS (1977):
Potassium Absorption by Rice at Different Levels of Organization.
I. Effects of Temperature and Calcium on K Fluxes and Content.
Physiol. Plant. 41, 99-104

FELLE,H. (1974):
Analyse der lichtinduzierten Membranpotentiale bei Riccia fluitans.
Dissertation, Tübingen

FELLE,H. and F.W.BENTRUP (1976):
Effect of Light upon Membrane Potential, Conductance, and Ion Fluxes in Riccia fluitans.
J. Membrane Biol. 27, 153-170

FELLE,H. and F.W.BENTRUP (1977):
A Study of the Primary Effect of the Uncoupler Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone on Membrane Potential and Conductance in Riccia fluitans.
Biochim. Biophys. Acta 464, 179-187

FINKELSTEIN,A. (1964):
Carrier Model for Active Transport of Ions across a Mosaic Membrane.
Biophys. J. 4, 421-440

FUJII,S., SHIMMEN,T. and M.TAZAWA (1979):
Effect of Intracellular pH on the Light-induced Potential Change and Electrogenic Activity in Tonoplast-free Cells of Chara australis.
Plant & Cell Physiol. 20, 1315-1328

GOLDSMITH,M.H.M. and R.E.CLELAND (1978):
The Contribution of Tonoplast and Plasma Membrane to the Electrical Properties of a Higher-Plant Cell.
Planta 143, 261-265

GREENHAM,C.G. (1966):
The Relative Electrical Resistances of the Plasmalemma and Tonoplast in Higher Plants.
Planta (Berl.) 69, 150-157

GRADMANN,D. (1975):
Analog Circuit of the Acetabularia Membrane.
J. Membrane Biol. 25, 183-208

GRADMANN,D.,WAGNER,G. and R.M.GLÄSEL (1973):
Chloride Efflux during Light-triggered Action Potentials in Acetabularia mediterranea.
Biochim. Biophys. Acta 323, 151-155

GRADMANN,D., HANSEN,U.-P., LONG,W.S., SLAYMAN,C.L. and J.WARNCKE (1978):
Current-Voltage Relationships for the Plasma Membrane and Its Principal Electrogenic Pump in Neurospora crassa: I. Steady-State Conditions.
J. Membrane Biol. 39, 333-367

GRADMANN,D. and H.MUMMERT (1980):
Plant Action Potentials.
in: Plant Membrane Transport: Current Conceptual Issues (R.M. Spanswick, W.J. Lucas and J. Dainty, eds.)
Elsevier/North-Holland Biomedical Press

GYENES,M., ANDRIANOV,V.K., BULYCHEV,A.A. and G.A. KURELLA (1978):
Light-induced H-Accumulation in the Vacuole of Nitellopsis obtusa.
J. Exp. Bot. 29, 1185-1195

HOPE,A.B. and P.A.ASCHBERGER (1970):
Effects of Temperature on Membrane Permeability to Ions.
Aust. J. Biol. Sci. 23, 1047-1060

KAWAMURA,G., SHIMMEN,T. and M.TAZAWA (1980):
Dependence of the Membrane Potential of Chara Cells on External pH in the Presence or Absence of Internal Adenosine-triphosphate.
Planta 149, 213-218

KEIFER,D.W. and R.M.SPANSWICK (1979):
Correlation of Adenosine Triphosphate Levels in Chara corallina with the Activity of the Electrogenic Pump.
Plant Physiol. 64, 165-168

KIKUYAMA,M. HAYAMA,T., FUJII,S. and M.TAZAWA (1979):
Relationship between Light-induced Potential Change and Internal ATP Concentration in Tonoplast-free Chara Cells.
Plant & Cell Physiol. 20, 993-1002

LEBLANC,O.H.jr. (1971):
The Effect of Uncouplers of Oxidative Phosphorylation on Lipid Bilayer Membranes: Carbonylcyanide m-Chlorophenyl-hydrazone.
J. Membrane Biol. 4, 227-251

LÜHRING,H. (1976):
Anwendung der Mikroelektrodentechnik zur Messung des intrazellulären pH bei Riccia fluitans.
Diplomarbeit, Tübingen

MERCIER,A.J. and R.J.POOLE (1980):
Electrogenic Pump Activity in Red Beet: Its Relation to ATP Levels and to Cation Influx.
J. Membrane Biol. 55, 165-174

MUMMERT,H. (1979):
Transportmechanismen für K,Na und Cl in stationären und dynamischen Zuständen bei Acetabularia.
Dissertation, Tübingen

PENNY,M.G. and D.J.F.BOWLING (1975):
Direct Determination of pH in the Stomatal Complex of Commelina.
Planta (Berl.) 122, 209-212

RAVEN,J.A. and S.M.GLIDEWELL (1975):
Effects of CCCP on Photosynthesis and on Active and Passive Chloride Transport at the Plasmalemma of Hydrodictyon africanum.
New Phytol. 75, 205-213

ROBINSON,K.R. (1977):
Reduced External Calcium or Sodium stimulates Calcium Influx in Pelvetia Eggs.
Planta 136, 153-158

RYBOVA,R., JANACEK,K. and M.SLAVIKOVA (1972):
Ionic Relations of the Alga Hydrodictyon reticulatum. The Effects of Light Conditions and Inhibitors.
Z. Pflanzenphysiol. 66, 420-432

SANDERS,D. (1980a):
Control of Plasma Membrane Cl Fluxes in Chara corallina by External Cl and Light.
J. Exp. Bot. 31, 105-118

SANDERS,D. (1980b):
Control of Cl Influx in Chara by Cytoplasmic Cl Concentration.
J. Membrane Biol. 52, 51-60

SHIMMEN,T. and M.TAZAWA (1977):
Control of Membrane Potential and Excitability of Chara Cells with ATP and Mg .
J. Membrane Biol. 37, 167-192

SLAYMAN,C.L. and D.GRADMANN (1975):
Electrogenic Proton Transport in the Plasma Membrane of Neurospora.
Biophys. J. 15, 968-971

SMITH,F.A. (1972):
Stimulation of Chloride Transport in Chara by External pH Changes.
New Phytol. 71, 595-601

SMITH,F.A. and N.A.WALKER (1976):
Chloride Transport in Chara corallina and the Electrochemical Potential Difference for Hydrogen Ions.
J. Exp. Bot. 27, 451-459

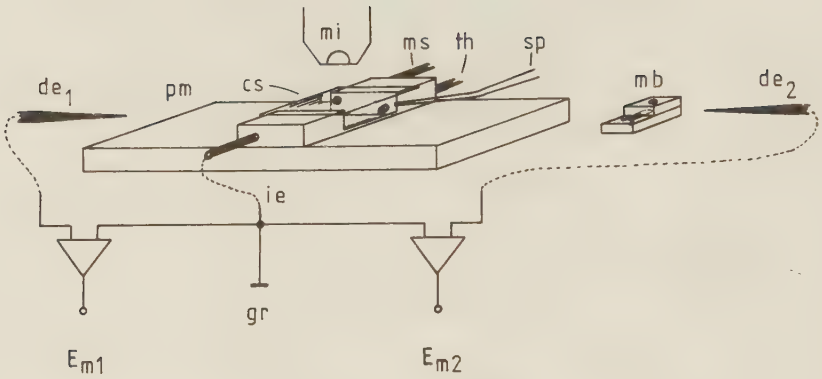


Fig. 1. Versuchsanordnung für elektrophysiologische Experimente zur Ableitung von Membranpotentialen und intrazellulärer Stromapplikation im stetigen Durchfluß von Testlösungen.

Bezeichnungen:

cs	... Deckglas
de1,2	... differente Elektroden 1 und 2
Em1,2	... Elektrometer 1 und 2
gr	... Erdpotential
ie	... indifferente Elektrode auf Erdpotential
mb	... Objekthalter aus Plexiglas
mi	... Mikroskop
ms	... Mediumzulauf
pm	... Plexiglasträger
sp	... Absaugpipette
th	... Thermoelement zur Temperaturkontrolle

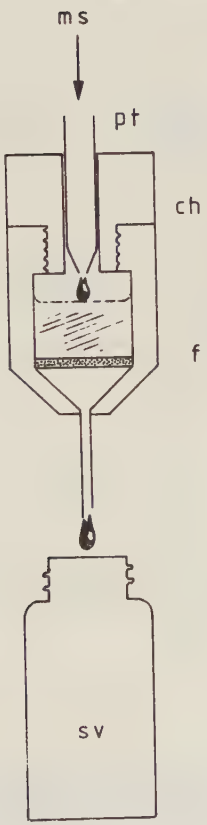


Fig. 2. Versuchsanordnung für Effluxexperimente.

Bezeichnungen:
ch ... Plexiglasküvette, in der radioaktiv markierte Pflanzen eluiert wurden
f ... Glasfritte
ms ... Mediumzulauf
pt ... Pipette
sv ... Szintillationsfläschchen

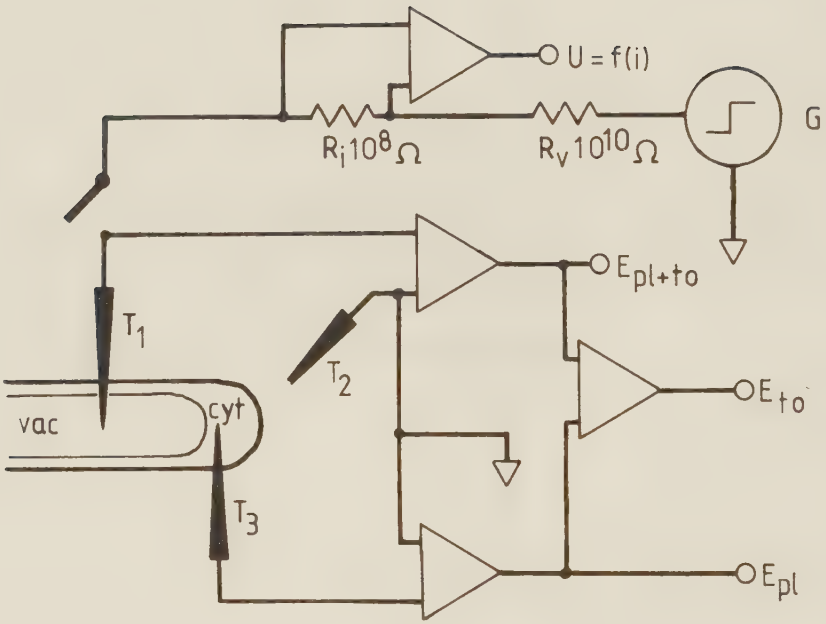


Fig. 3. Schematische Darstellung der Ableitung von Potentialen aus den Kompartimenten Cytoplasma und Vakuole.

Elektrode T1 mißt die Potentialdifferenz über Tonoplast und Plasmalemma E(pl+to) in Serie, T3 nur über das Plasmalemma; als Referenz (Erdpotential) dient T2. Alle Elektroden sind symmetrisch gebaut (Ag/AgCl/KCl). Die Differenz beider Elektrometerausgänge zeigt die Potentialdifferenz über den Tonoplasten E(to). Stromapplikation über T1 oder T3 ist möglich. Der Generator G liefert Rechtecksignale; Rv sorgt für eine konstante Stromquelle; Ri dient der Strommessung, U=fn(i).

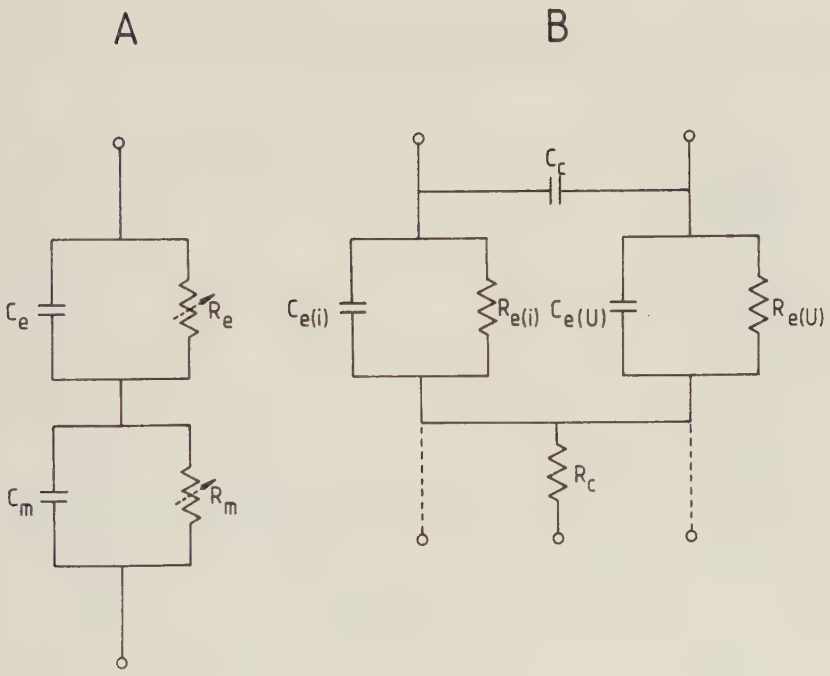


Fig. 4. a. Spannungsmessung und Stromapplikation durch eine Elektrode. Vereinfachte Darstellung des Verhaltens der Elektrodenspitze und Plasmamembran in Serie. Problem bei Stromapplikation ist die Zuordnung von Widerstandsänderungen: antwortet die Elektrode (Re) oder die Membran (Rm)?

b. Spannungsmessung und Stromapplikation mit Hilfe von 'double- barreled' (Doppel-)Elektroden. Vereinfachte Darstellung der Kopplungseigenschaften von Strom- (Index i) und Spannungselektrode (u). C(c): Kopplungskapazität; R(c): Kopplungswiderstand. Erläuterung im Text (s. Anhang 3.).

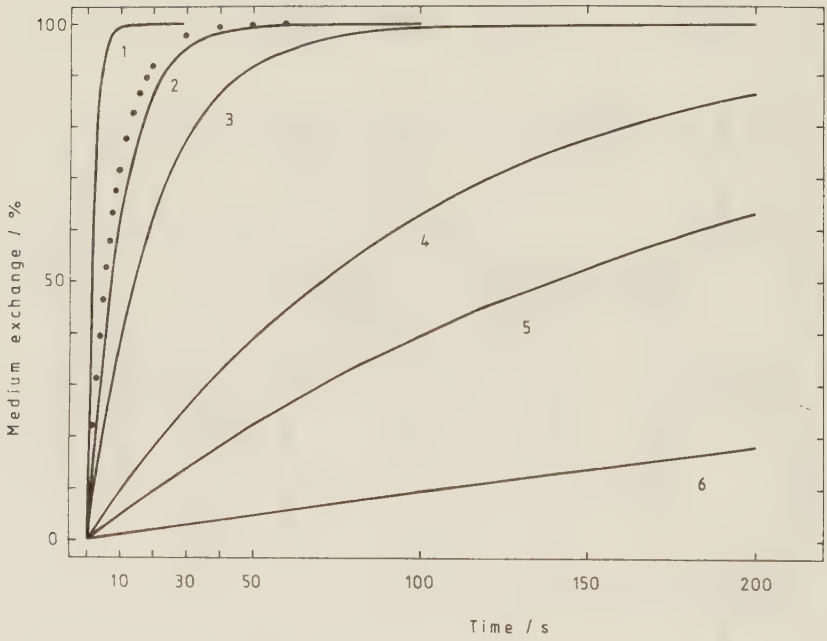


Fig. 5. Zeitfunktionen der Konzentrationsänderung in der Küvette nach Mediumwechsel bei stetigem Durchfluß. Die durchgezogenen Kurven stellen Funktionen für verschiedene Fließgeschwindigkeiten dar, die gepunktete Kurve bezeichnet den langsamsten Austausch in den ausgeführten Experimenten (Funktion vgl. Anhang 1).

Zeitkonstanten:

1	...	2 sec	4	...	100 sec
2	...	10 sec	5	...	200 sec
3	...	20 sec	6	...	1000 sec

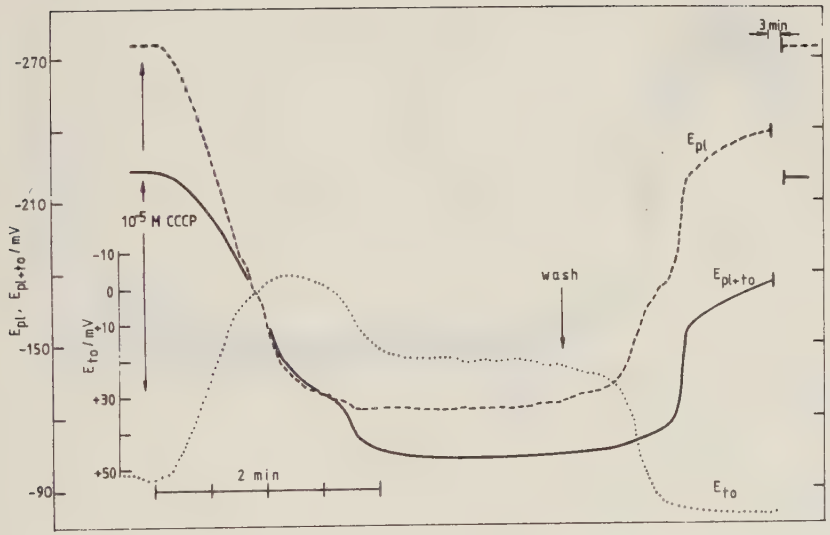


Fig. 6. Änderung der Potentialdifferenz über Plasmalemma und Tonoplast nach Austausch des Inkubationsmediums III, pH 7.5 gegen III, pH 7.5 + 1E-5 M CCCP; anschließend Auswaschen mit Inkubationsmedium (wash). Dauerlicht, 295 K.

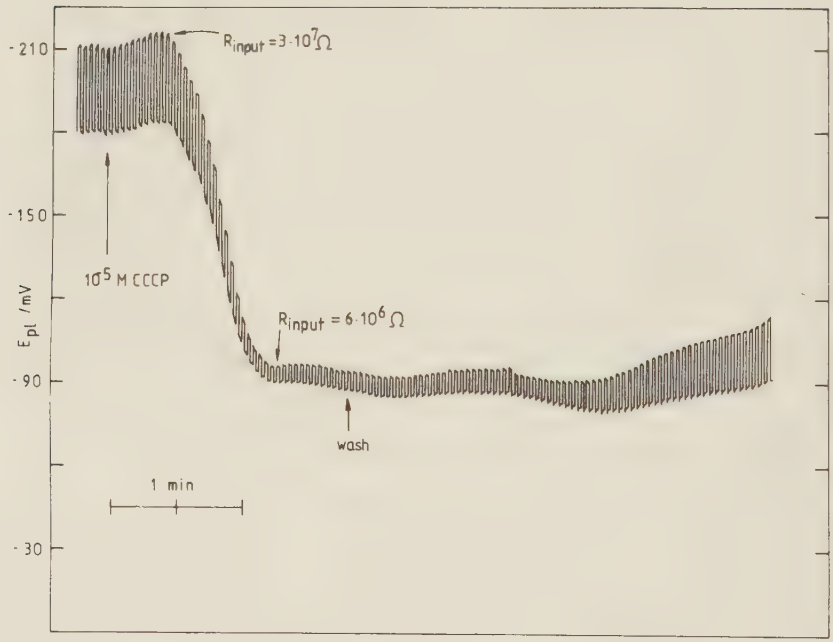


Fig. 7. Änderung der Potentialdifferenz und des Eingangswiderstandes über dem Plasmalemma nach Austausch des Inkubationsmediums III, pH 6 gegen III, pH 6 + 1E-5 M CCCP; anschließend Auswaschen mit Inkubationsmedium (wash).Stromapplikation (hyperpolarisierendes Rechtecksignal) und Spannungsmessung mit Doppelelektrode. Dauerlicht, 295 K.

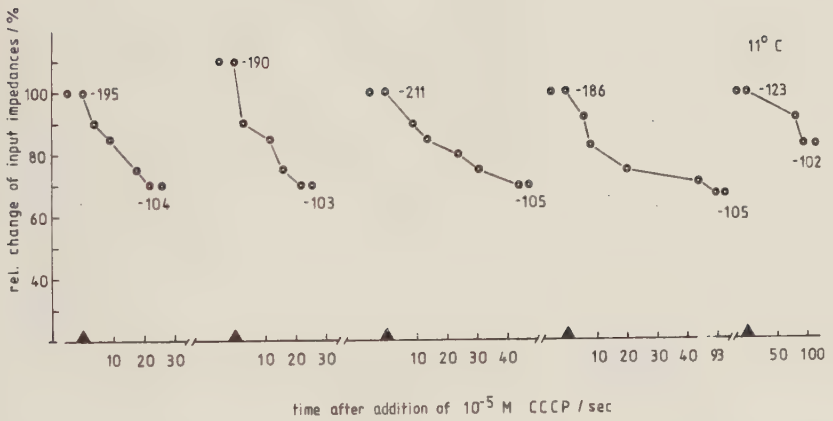


Fig. 8. Relative Änderung des Eingangswiderstandes einer Rhizoidzelle (E(pl+to)) nach Austausch des Inkubationsmediums III, pH 7.5 gegen III, pH 7.5 + 1E-5 M CCCP. Die Zahlen an den Kurven kennzeichnen das jeweils gemessene Membranpotential. Dauerlicht, 295 K.

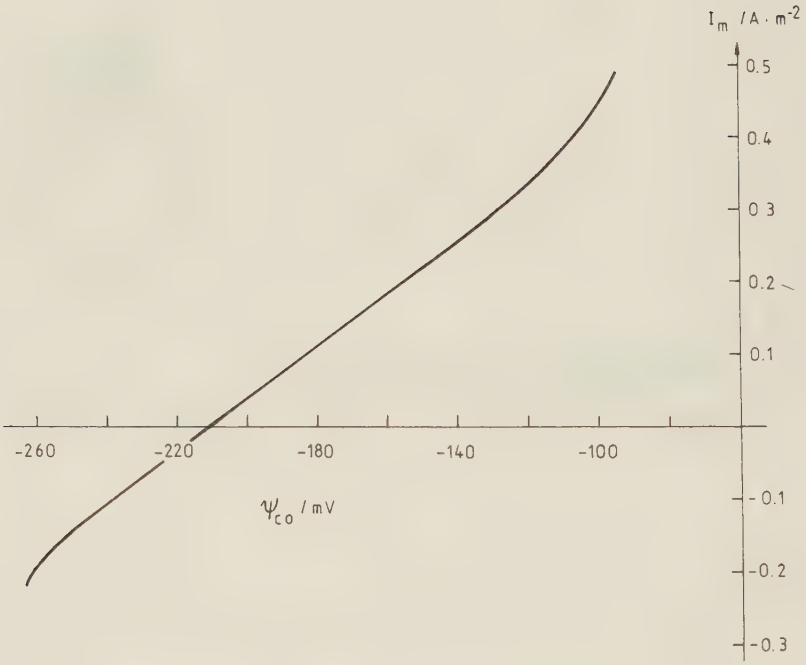


Fig. 9. Strom/Spannungs-Kennlinie des Plasmalemmas einer Rhizoidzelle. Strom- und Ableitelektrode in der cytoplasmatischen Kappe; Inkubationsmedium III, pH 5.5; Dauerlicht, 295 K.

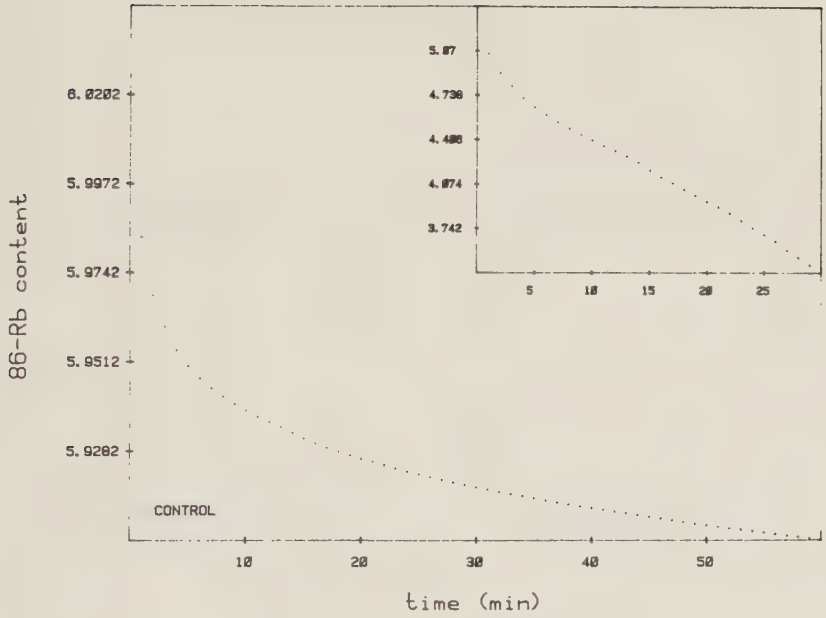


Fig. 10. Effluxkinetik einer mit Rb-86 'aufgeladenen' Gewebeprobe. Dargestellt ist der intrazelluläre Rb-Gehalt als Funktion der Zeit. Die lineare Komponente entspricht der Abgabekinetik der Vakuole, in der eingeschobenen Kurve der des Plasmalemmas. Inkubationsmedium I, pH 7; Dauerlicht, 298 K.

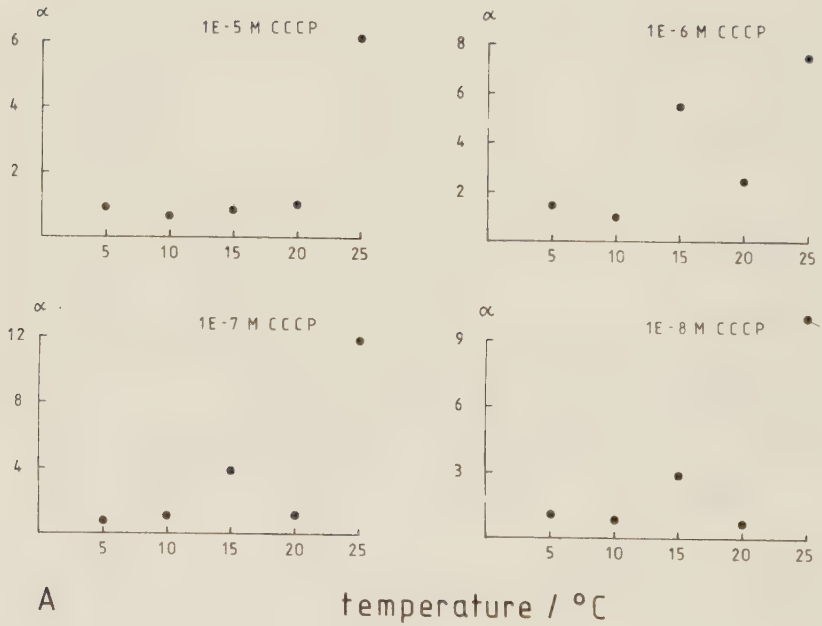
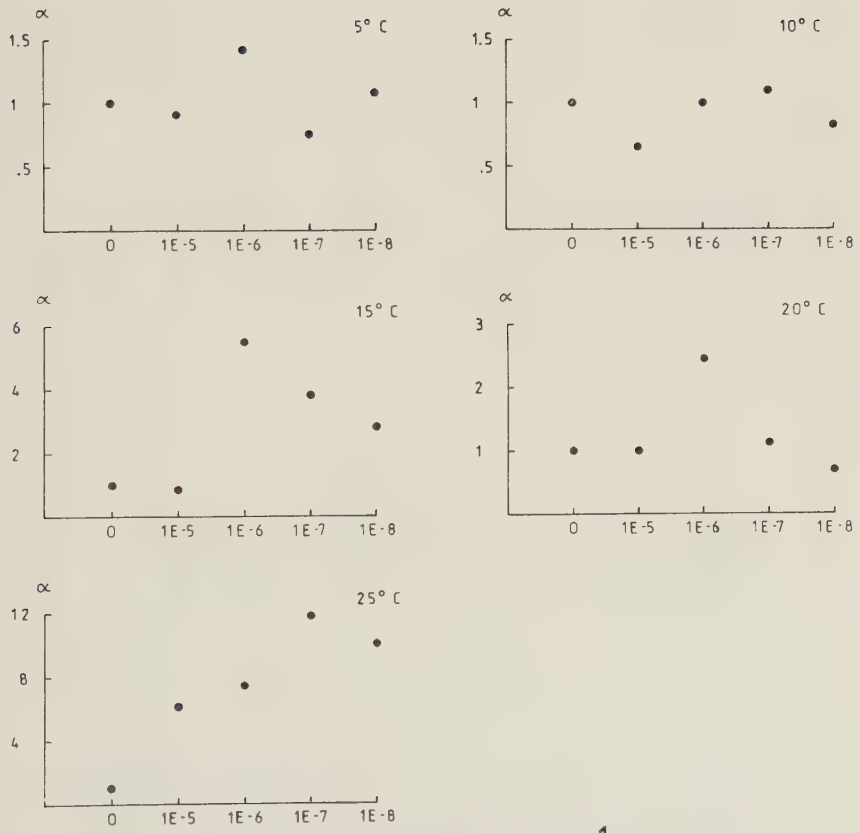


Fig. 11. Temperatur- und CCCP-abhängige Änderung des K/Rb-Konzentrationsverhältnisses in Cytoplasma und Vakuole, α. Die Abweichung der Punkte vom konstanten Wert 1 der Kontrolle ist ein Maß für die Änderung (vgl. Kap. 2.2.1.); Temperatur in Grad Celsius.

A. Temperaturabhängigkeit, CCCP-Konzentration als Parameter;
B. CCCP-Abhängigkeit, Temperatur als Parameter.


α
5° C
1.5
1
.5
0
1E-5
1E-6
1E-7
1E-8
10° C
15° C
6
4
2
20° C
3
2
1
25° C
12
8
4
B
[CCCP] / moles · l-1

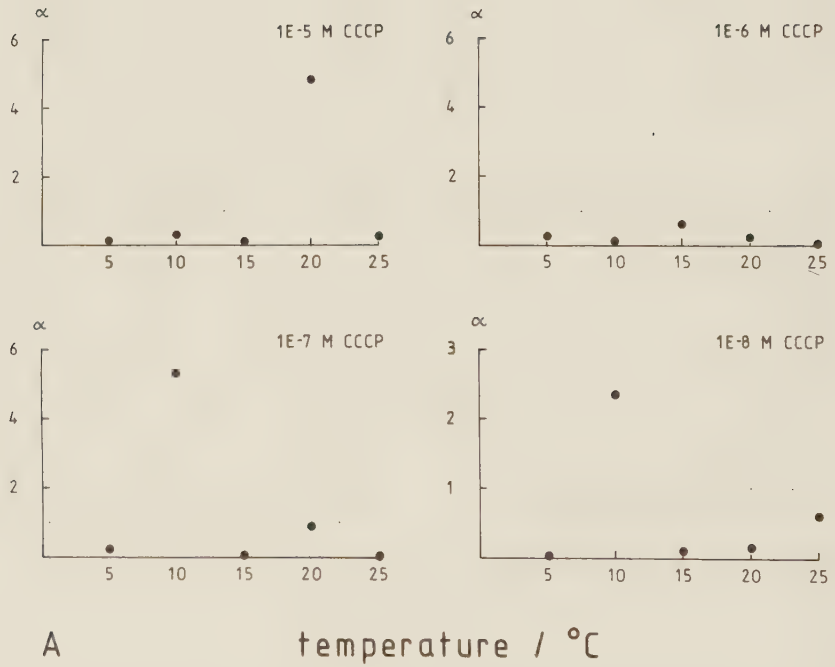
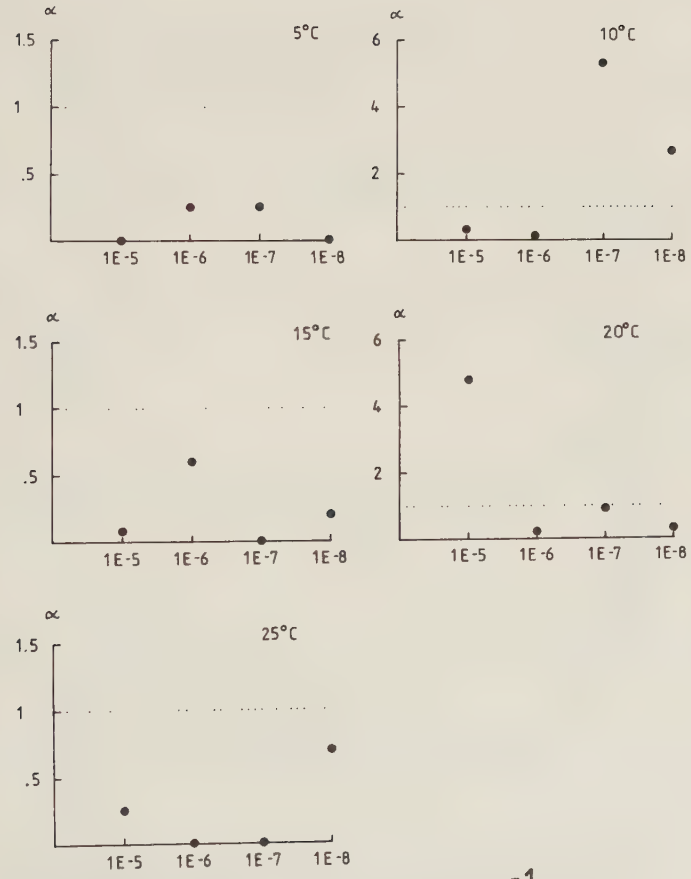


Fig. 12. Änderung des Cl-Konzentrationsverhältnisses in Cytoplasma und Vakuole, α. Temperatur in Grad Celsius.

A. Temperaturabhängigkeit, CCCP-Konzentration als Parameter;
B. CCCP-Abhängigkeit, Temperatur als Parameter.


α
5°C
1.5
1
.5
1E-5
1E-6
1E-7
1E-8
α
10°C
6
4
2
1E-5
1E-6
1E-7
1E-8
α
15°C
1.5
1
.5
1E-5
1E-6
1E-7
1E-8
α
20°C
6
4
2
1E-5
1E-6
1E-7
1E-8
α
25°C
1.5
1
.5
1E-5
1E-6
1E-7
1E-8
B
[CCCP] / moles·l^{-1}

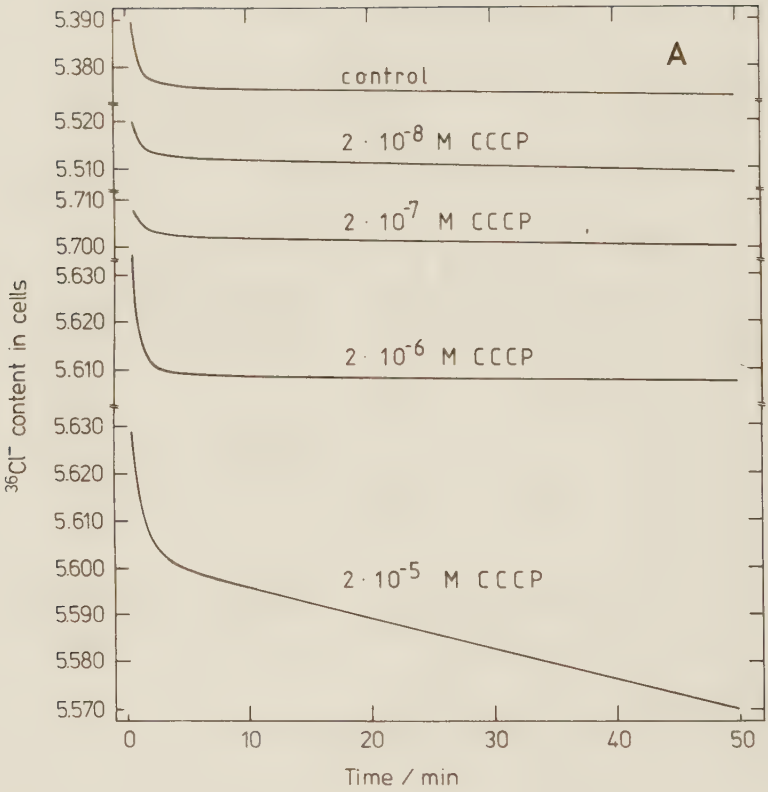
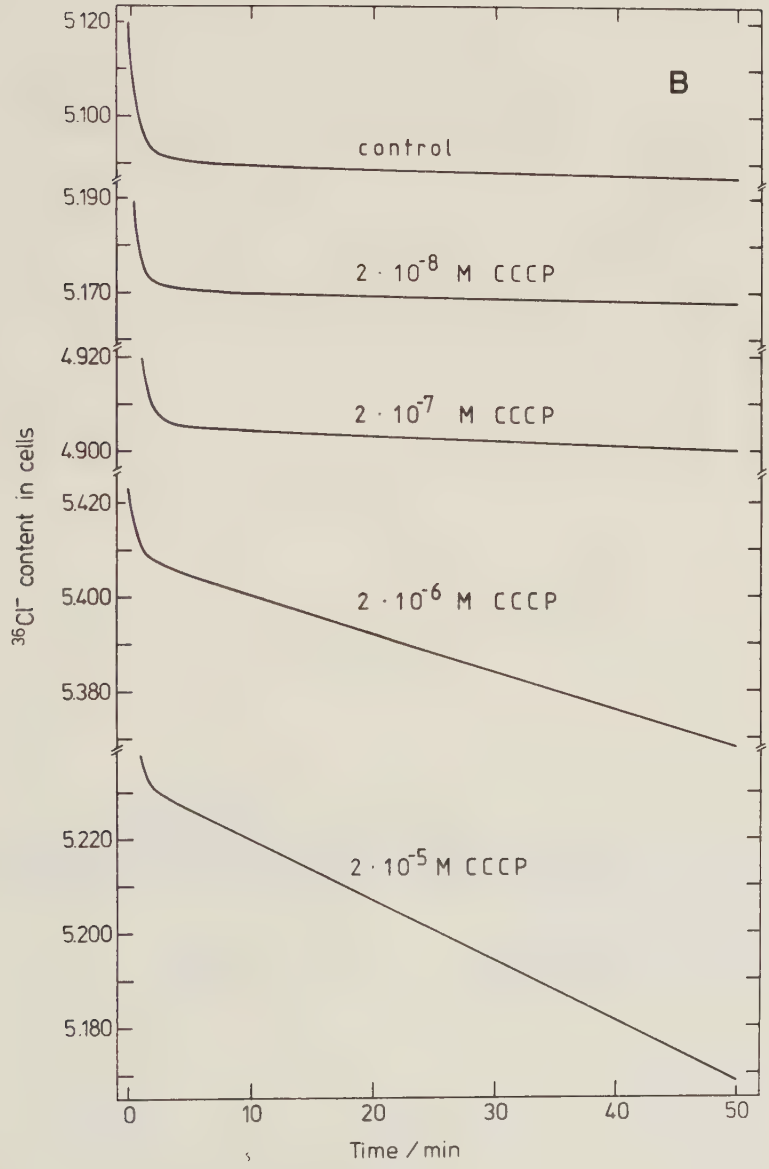


Fig. 13. Cl-36 Effluxkinetiken.Dargestellt sind Experimente an sechs Gewebeproben zum Vergleich der Wirkung verschiedener CCCP-Konzentrationen. Ordinaten geschachtelt. Inkubationsmedium: I, pH 7.

A. Temperatur: 278 K;
B. Temperatur: 298 K.


B
control
2 · 10-8 M CCCP
2 · 10-7 M CCCP
2 · 10-6 M CCCP
2 · 10-5 M CCCP
5.120
5.100
5.190
5.170
4.920
4.900
5.420
5.400
5.380
5.220
5.200
5.180
0
10
20
30
40
50
Time / min
36Cl- content in cells

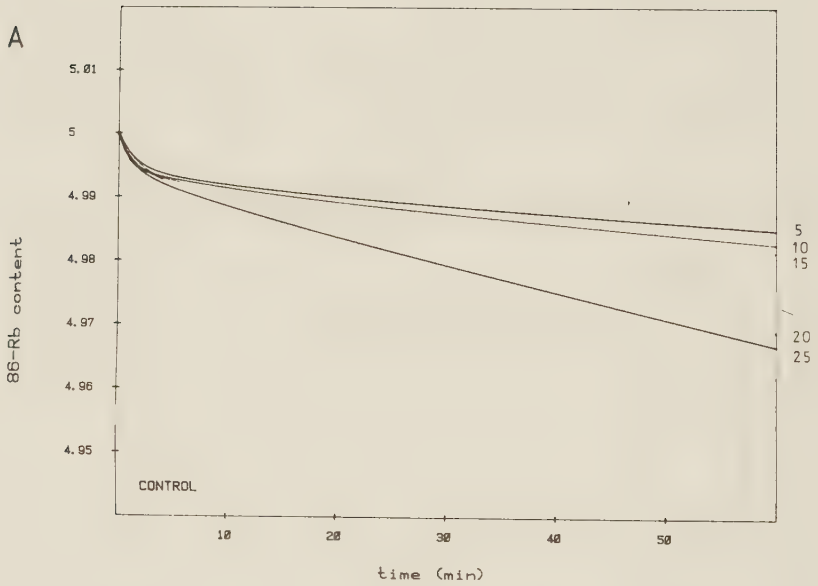
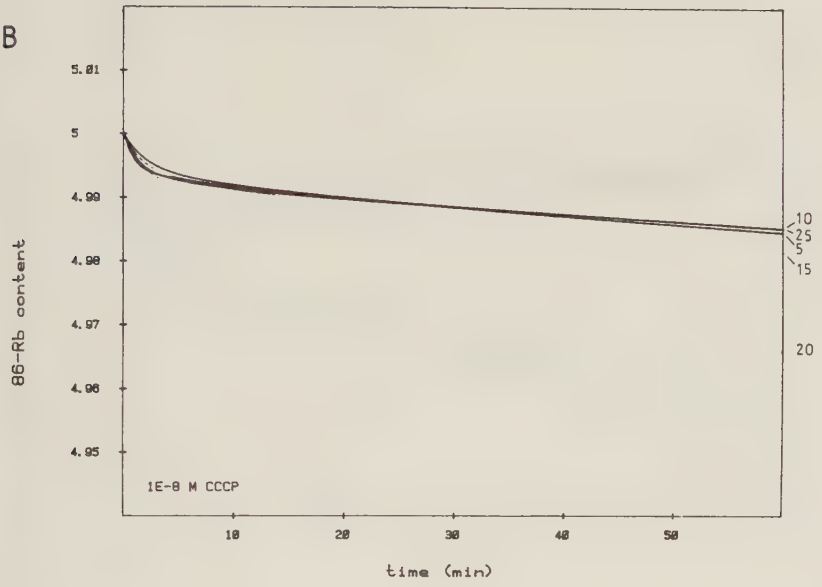


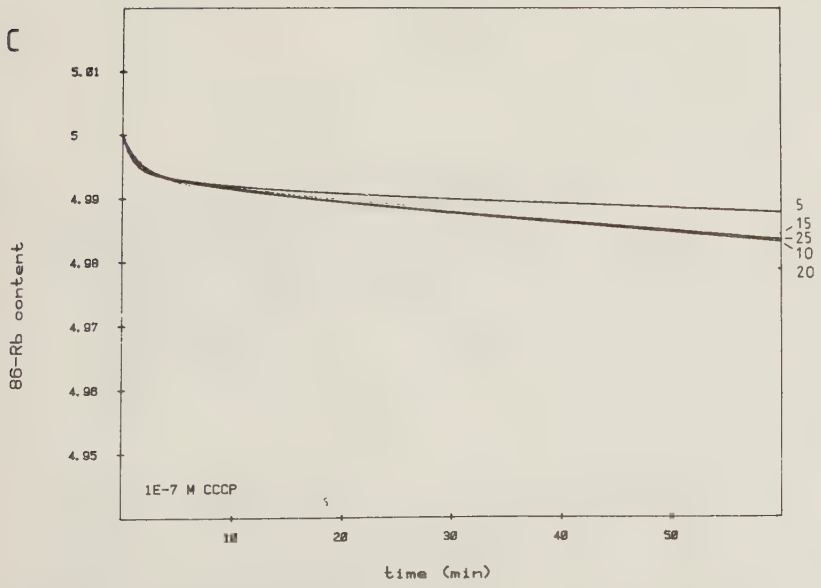
Fig. 14. Temperaturgang der Rb-86 Effluxkinetik über den Tonoplasten (Kurven sind mit Grad Celsius indiziert). Inkubationsmedium I, pH 7; Dauerlicht.

A. Kontrolle
B. 1E-8 M CCCP
C. 1E-7 M CCCP
D. 1E-6 M CCCP
E. 1E-5 M CCCP

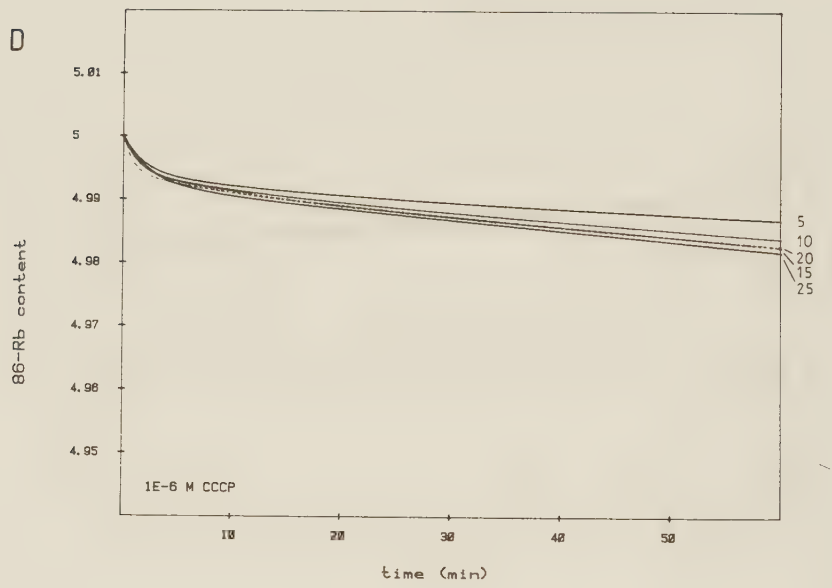
B


5.01
5
4.99
4.98
4.97
4.96
4.95
86-Rb content
1E-8 M CCCP
10
20
30
40
50
time (min)
10
25
5
15
20

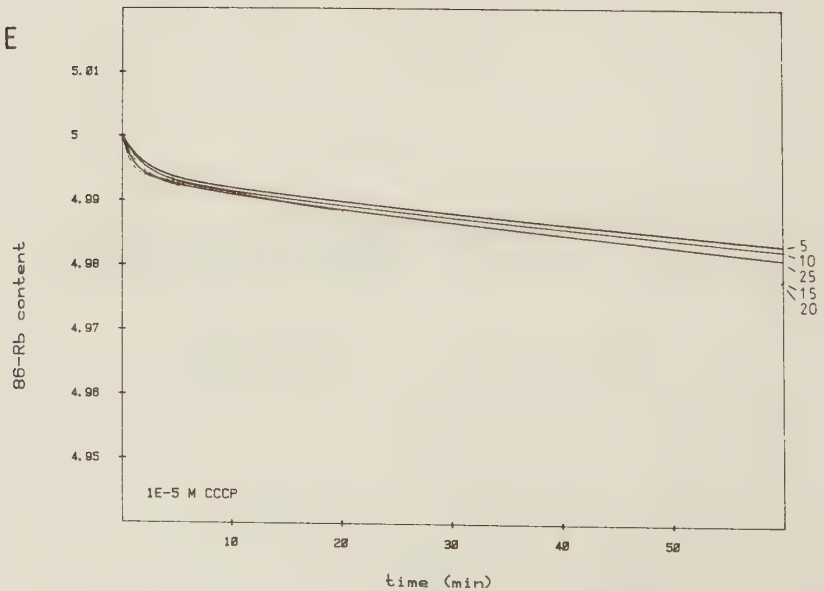
C


5.01
5
4.99
4.98
4.97
4.96
4.95
86-Rb content
1E-7 M CCCP
10
20
30
40
50
time (min)
5
15
25
10
20

D


5.01
5
4.99
4.98
4.97
4.96
4.95
86-Rb content
1E-6 M CCCP
10
20
30
40
50
time (min)
5
10
20
15
25

E


5.01
5
4.99
4.98
4.97
4.96
4.95
86-Rb content
1E-5 M CCCP
10
20
30
40
50
time (min)
5
10
25
15
20

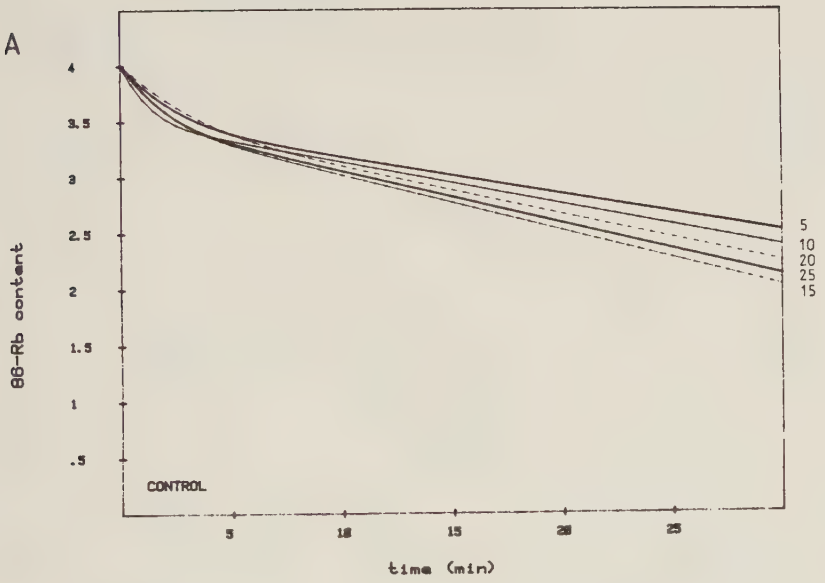
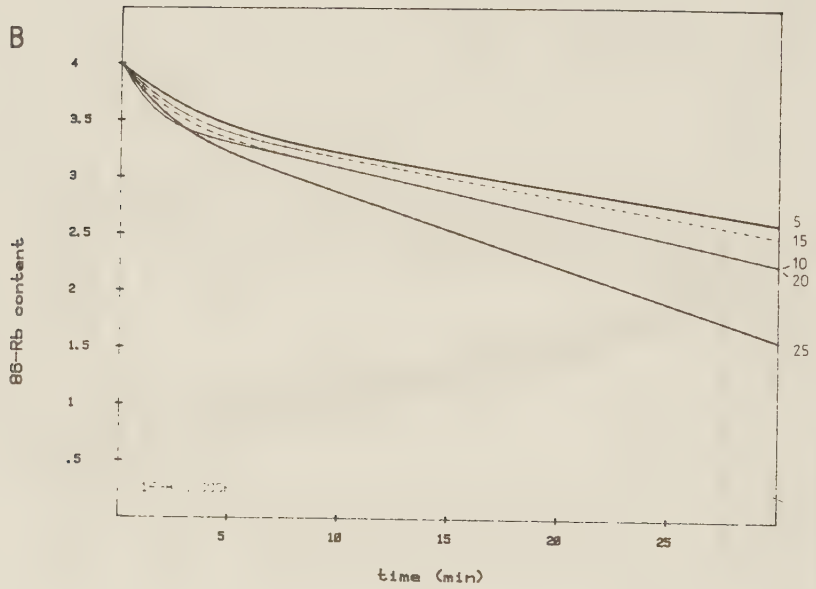
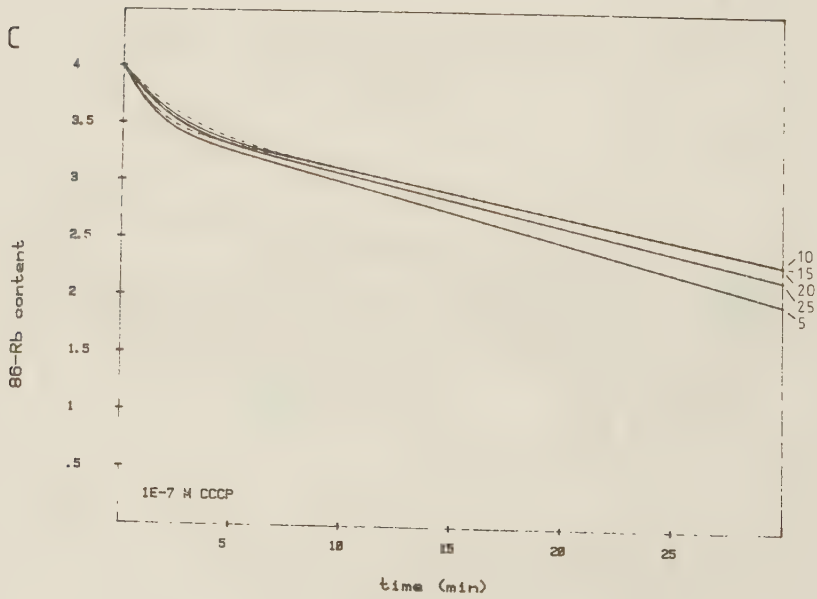


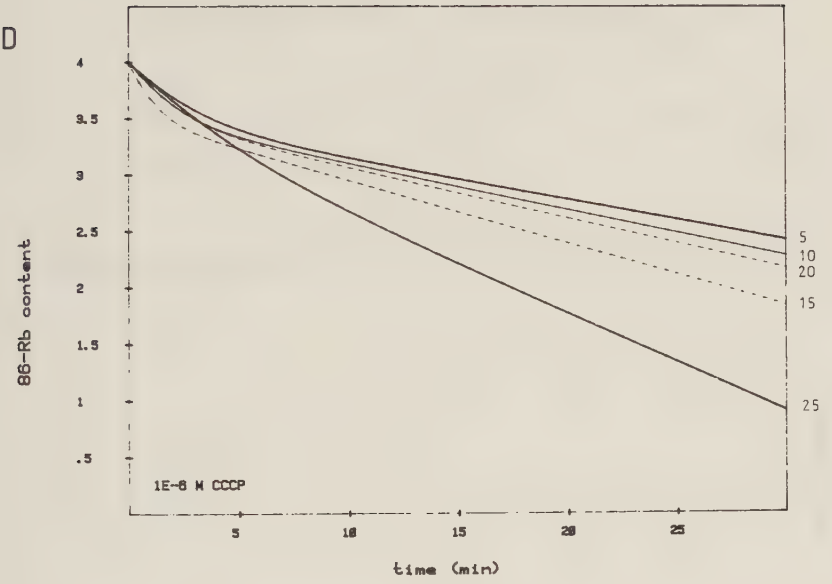
Fig. 15. Temperaturgang der Rb-86 Effluxkinetik über das Plasmalemma (Kurven mit Grad Celsius indiziert). Inkubationsmedium I, pH 7; Dauerlicht.

A. Kontrolle
B. 1E-8 M CCCP
C. 1E-7 M CCCP
D. 1E-6 M CCCP
E. 1E-5 M CCCP

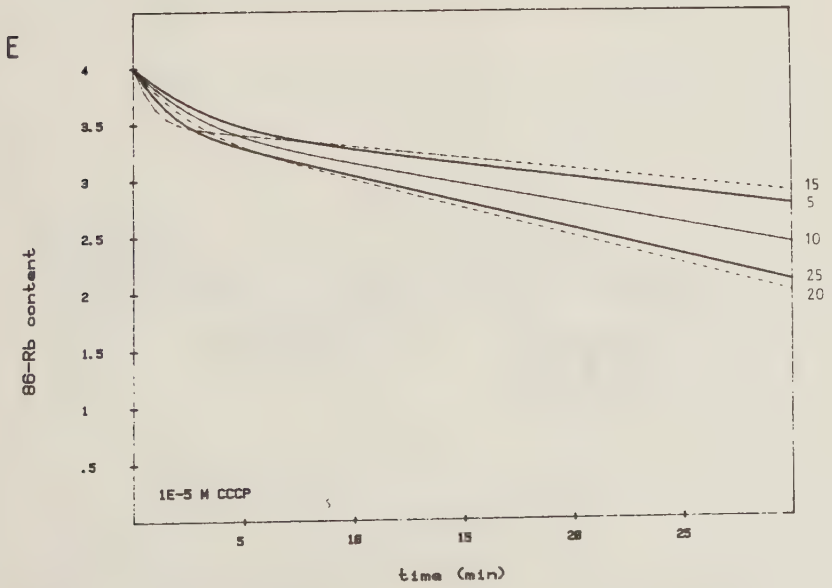

B
86-Rb content
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
.5
5
10
15
20
25
time (min)


C
86-Rb content
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
.5
1E-7 M CCCP
10
15
20
25
5
time (min)

D


86-Rb content
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
.5
1E-6 M CCCP
5
10
15
20
25
5
10
15
20
25
time (min)

E


86-Rb content
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
.5
1E-5 M CCCP
15
5
10
25
20
5
10
15
20
25
time (min)

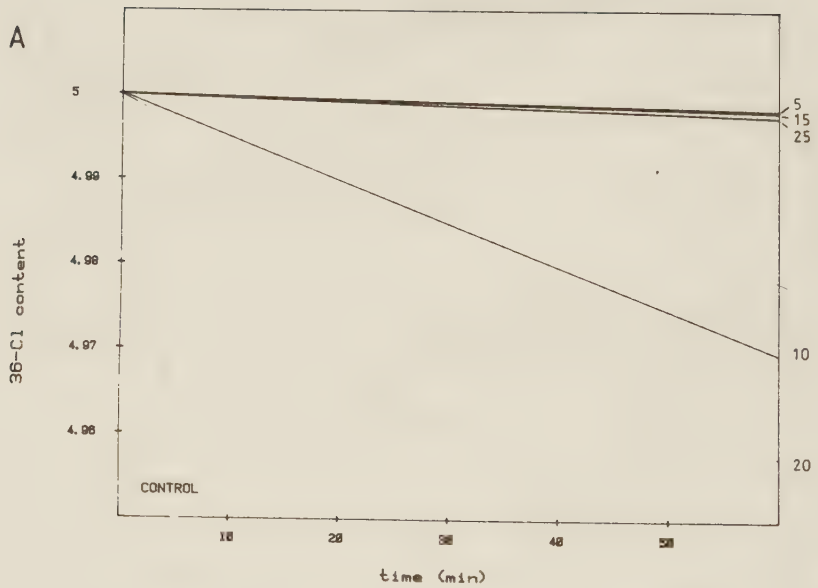
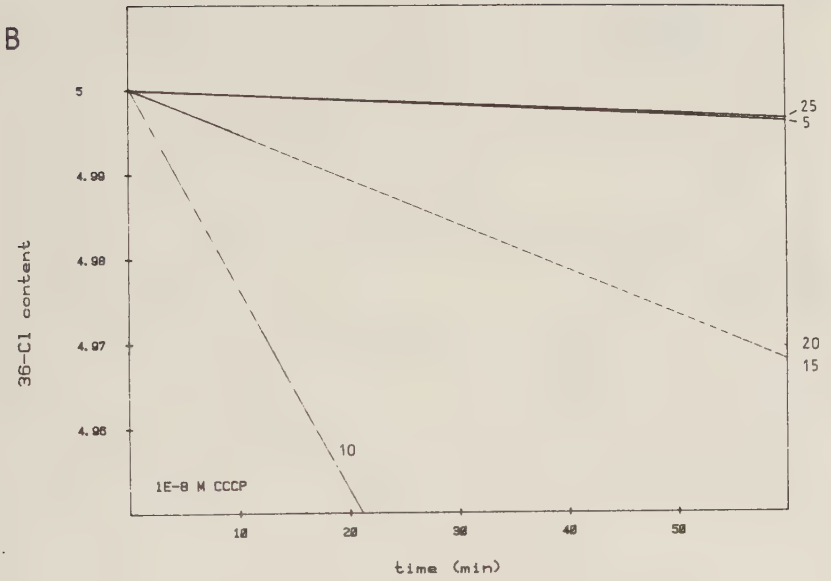


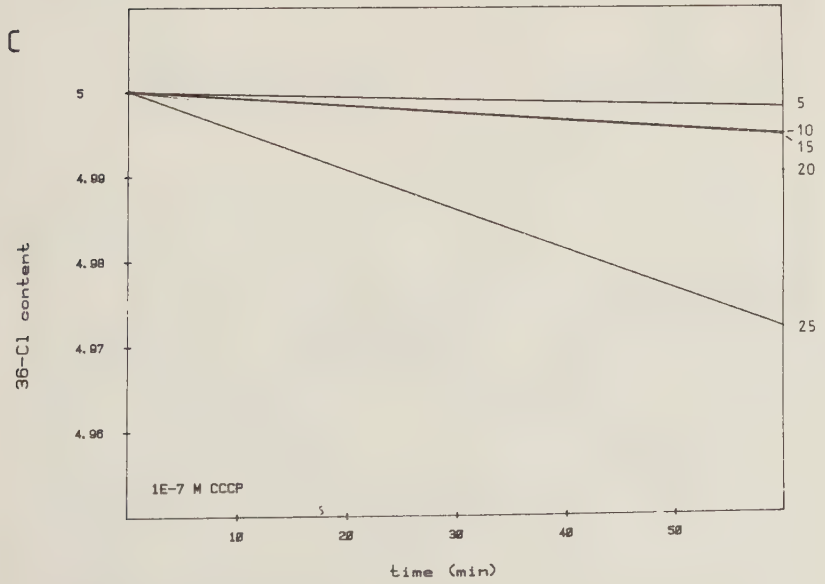
Fig. 16. Temperaturgang der Cl-36 Effluxkinetik über den Tonoplasten (Kurven mit Grad Celsius indiziert). Inkubationsmedium I, pH 7; Dauerlicht.

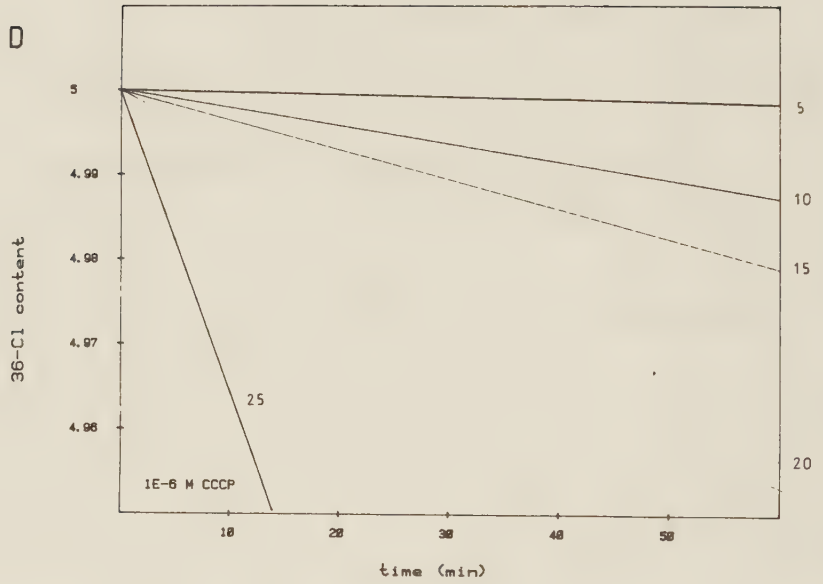
A. Kontrolle
B. 1E-8 M CCCP
C. 1E-7 M CCCP
D. 1E-6 M CCCP
E. 1E-5 M CCCP

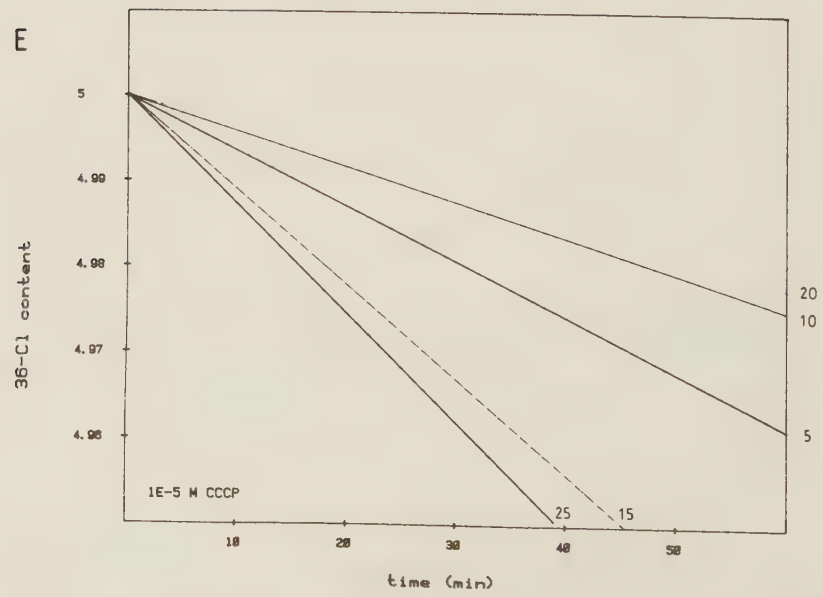
B


5
4.99
4.98
4.97
4.96
36-Cl content
25
5
20
15
10
1E-8 M CCCP
10
20
30
40
50
time (min)

C


5
4.99
4.98
4.97
4.96
36-Cl content
5
10
15
20
25
1E-7 M CCCP
10
20
30
40
50
time (min)


D
36-Cl content
5
4.99
4.98
4.97
4.96
1E-6 M CCCP
25
5
10
15
20
10
20
30
40
50
time (min)


E
36-Cl content
5
4.99
4.98
4.97
4.96
1E-5 M CCCP
25
15
20
10
5
10
20
30
40
50
time (min)

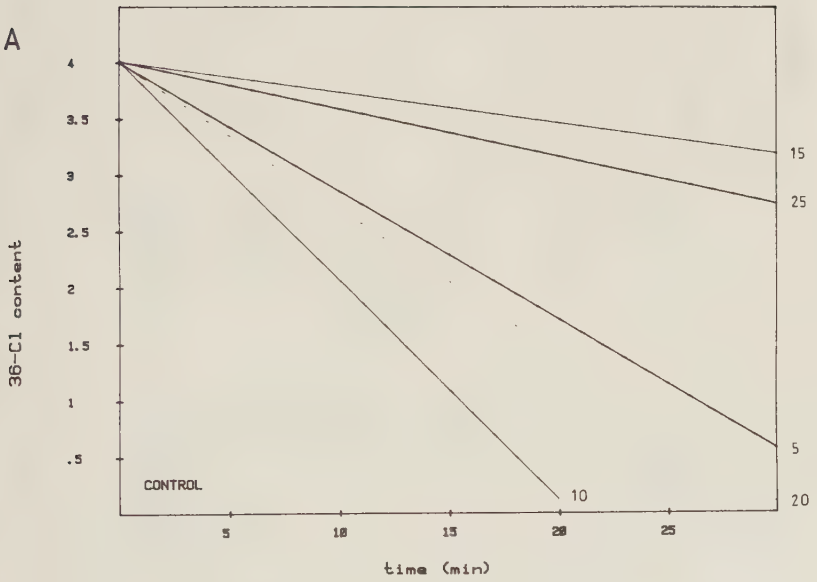
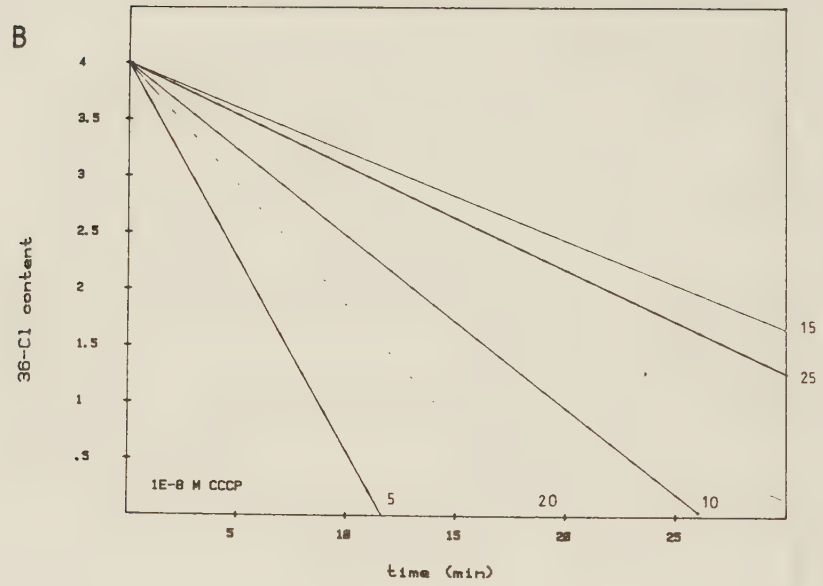
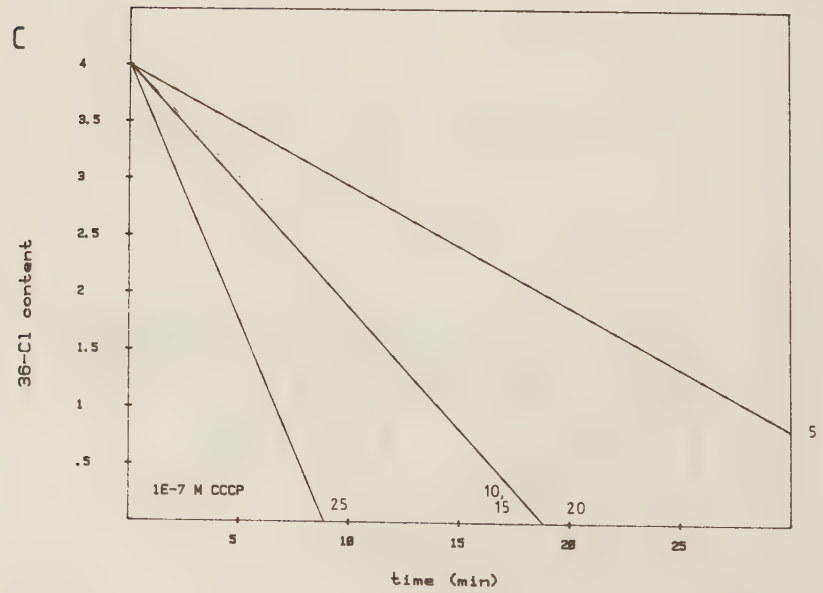


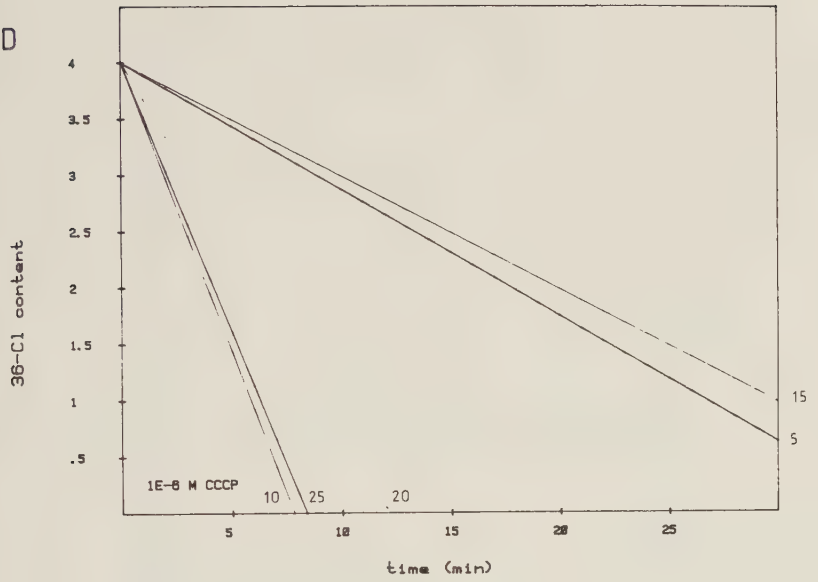
Fig. 17. Temperaturgang der Cl-36 Effluxkinetik über das Plasmalemma (Kurven mit Grad Celsius indiziert). Inkubationsmedium I, pH 7; Dauerlicht.

A. Kontrolle
B. 1E-8 M CCCP
C. 1E-7 M CCCP
D. 1E-6 M CCCP
E. 1E-5 M CCCP

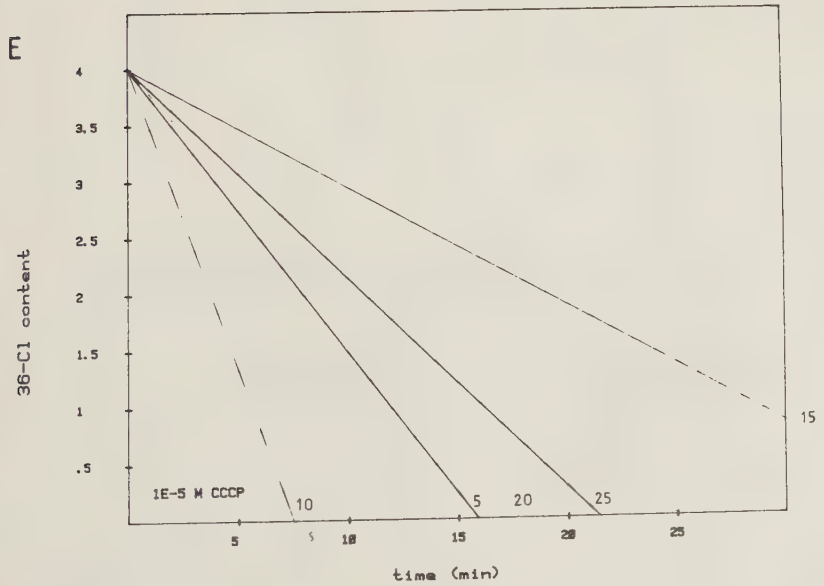

B
36-Cl content
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
.5
1E-8 M CCCP
5
20
10
15
25
5
10
15
20
25
time (min)


C
36-Cl content
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
.5
1E-7 M CCCP
25
10
15
20
5
5
10
15
20
25
time (min)

D


36-Cl content
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
.5
1E-6 M CCCP
10
25
20
15
5
5
10
15
20
25
time (min)

E


36-Cl content
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
.5
1E-5 M CCCP
10
5
20
25
15
5
10
15
20
25
time (min)

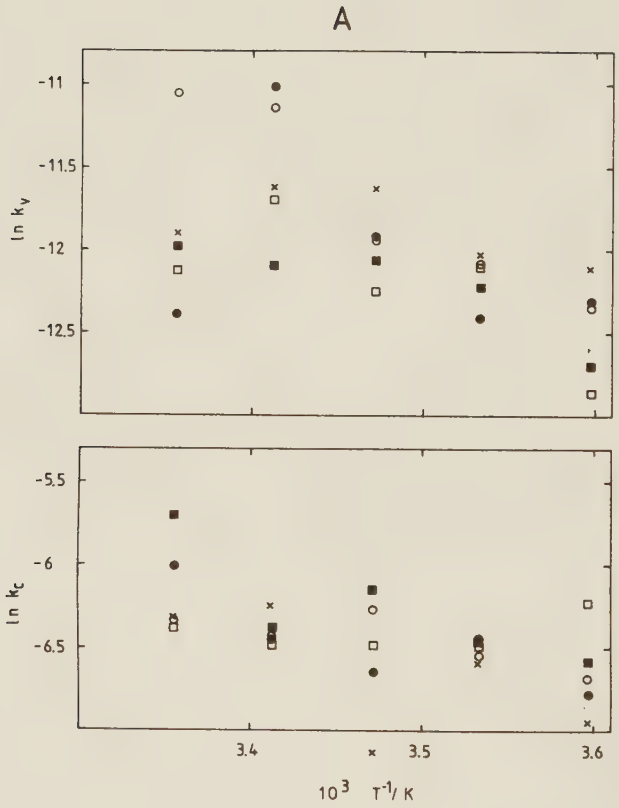
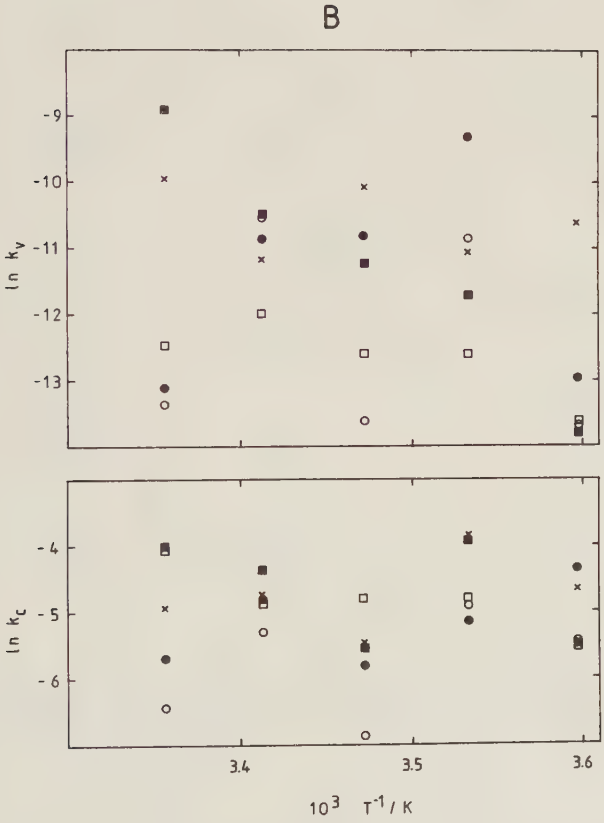


Fig. 18. Darstellung der Arrhenius-Funktion; CCCP-Konzentration als Parameter; oberer Bildteil: Tonoplast; unten: Plasmalemma.

○ Kontrolle
● 1E-8 M CCCP
□ 1E-7 M CCCP
■ 1E-6 M CCCP
× 1E-5 M CCCP

A. Rb-86 Efflux;
B. Cl-36 Efflux.


B
-9
-10
-11
-12
-13
ln k_v
-4
-5
-6
ln k_c
3.4
3.5
3.6
10^3 T^{-1} / K

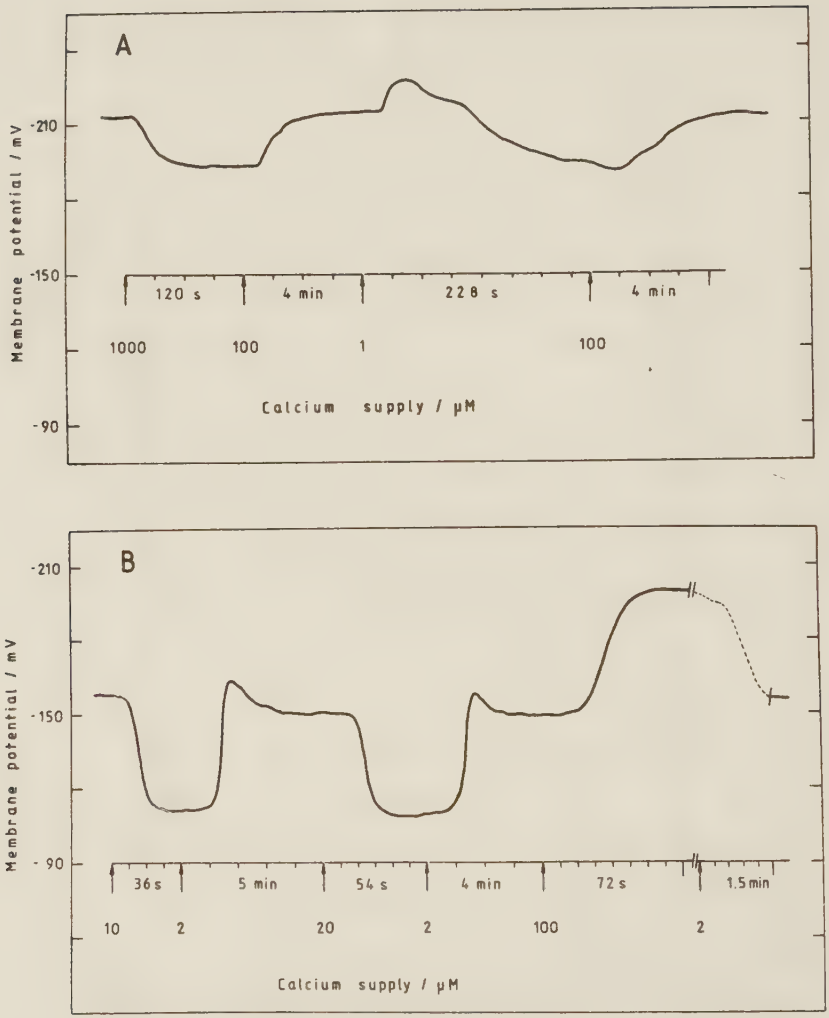
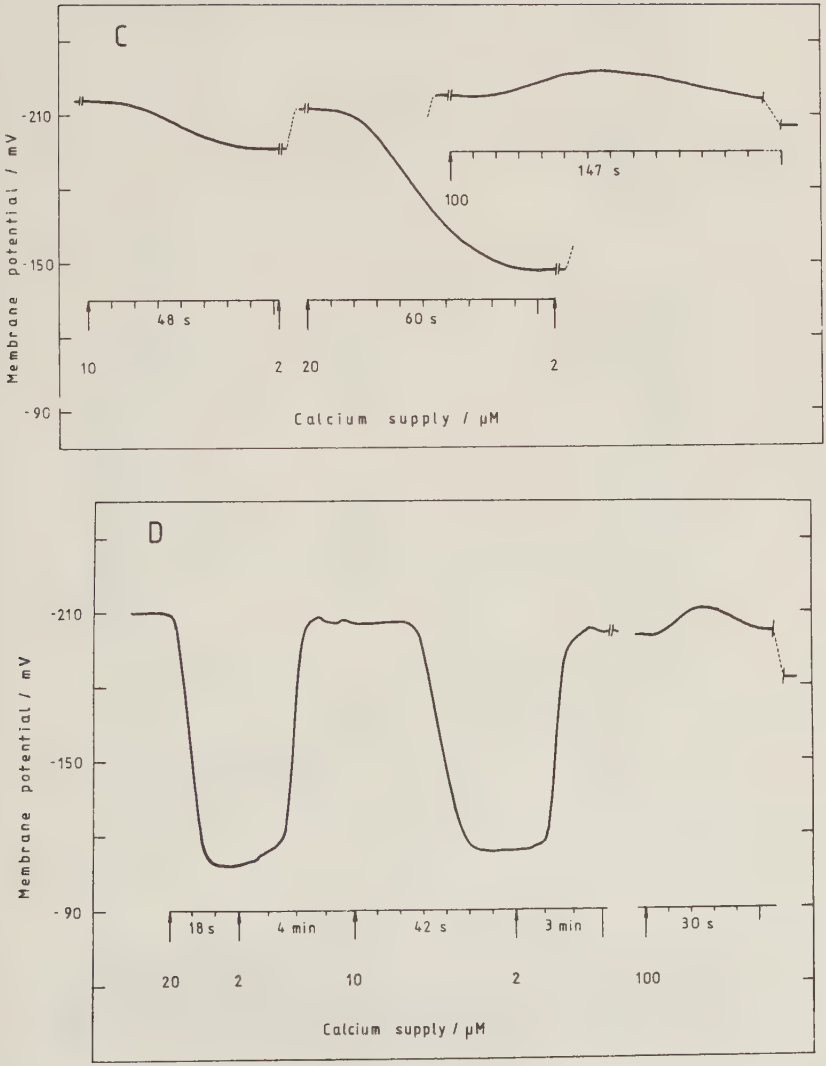


Fig. 19. Änderung des Membranpotentials einer Thalluszelle nach Austausch des Inkubationsmediums

A. III, pH 5.5, 1E-4 M Ca gegen III, pH 5.5, 1E-3 M Ca; 1E-6 M Ca; Dauerlicht, 295 K.

B. III, pH 5.5., 2E-6 M Ca gegen III, pH 5.5, 1E-5 M Ca; 2E-5 M Ca; 1E-4 M Ca; Dauerlicht,295 K.



C. III, pH 6, 2E-6 M Ca gegen III, pH 6, 1E-5 M Ca; 2E-5 M Ca; 1E-4 M Ca; Dauerlicht, 295 K.

D. III, pH 6.5, 2E-6 M Ca gegen III, pH 6.5, 1E-5 M Ca; 2E-5 M Ca; 1E-4 M Ca; Dauerlicht, 295 K.

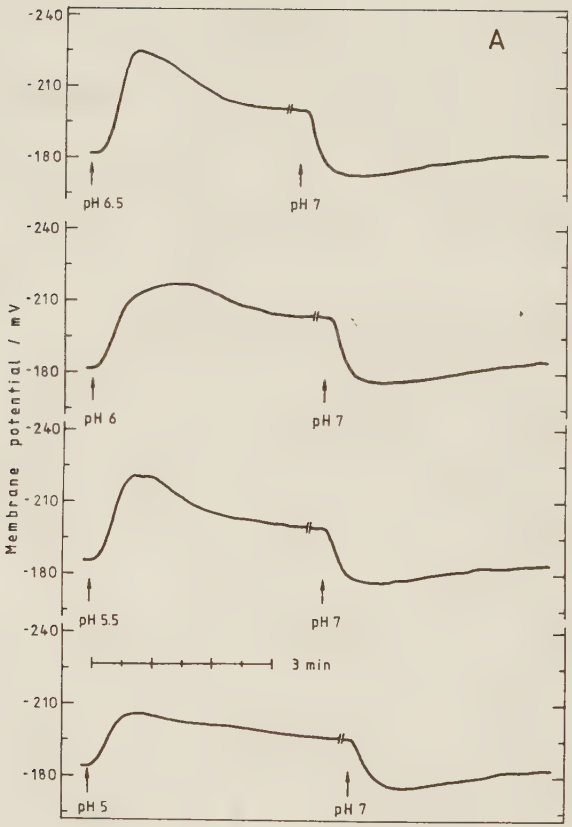
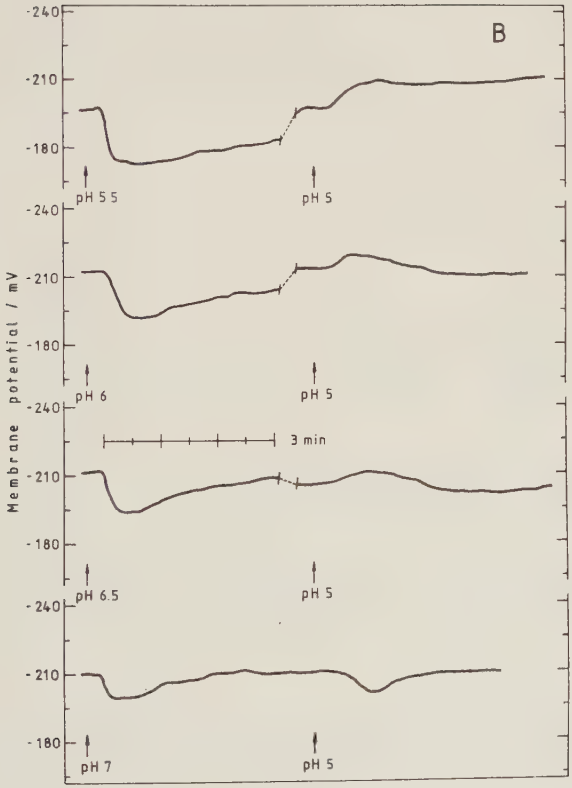


Fig. 20. Änderung des Membranpotentials einer Thalluszelle nach Austausch des Inkubationsmediums

A. III, pH 7, 2E-6 M Ca gegen III, 2E-6 M Ca, pH 6.5; pH 6; pH 5.5; pH 5; Dauerlicht, 295 K.



B. III, pH 5, 2E-6 M Ca gegen III, 2E-6 M Ca, pH 5.5; pH 6; pH 6.5; pH 7; Dauerlicht, 295 K.

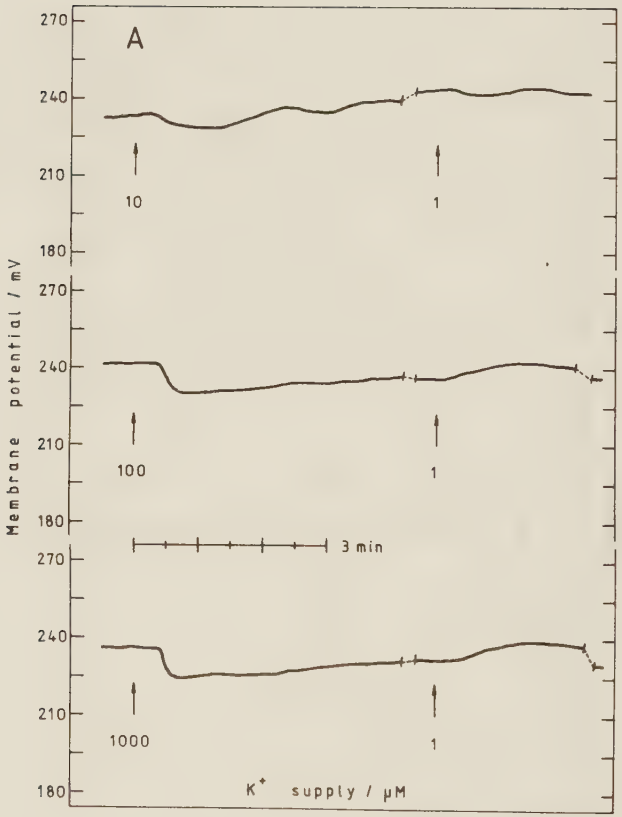
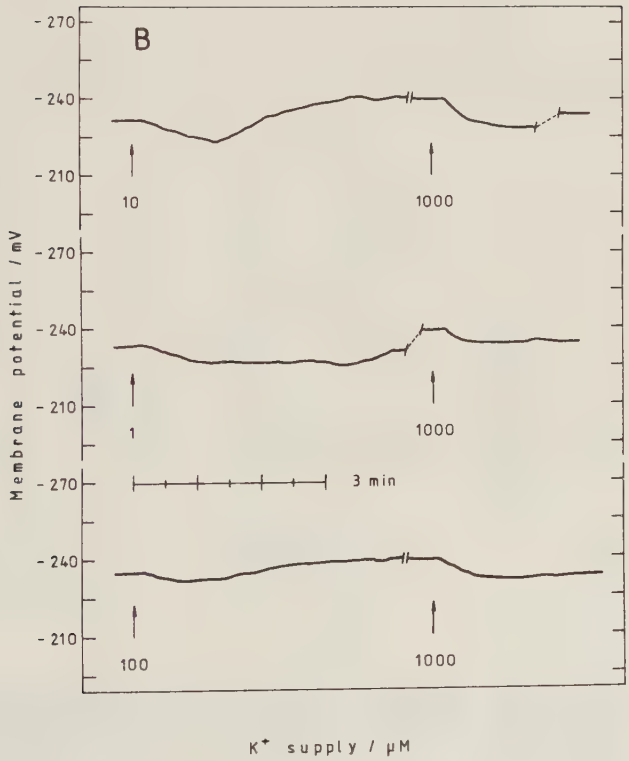


Fig. 21. Änderung des Membranpotentials einer Thalluszelle nach Austausch des Inkubationsmediums

A. I'(1 uM K), pH 6.5, 2E-6 M Ca gegen pH 6.5, 2E-6 M Ca, I; II; III; Dauerlicht, 295 K.



B. III, pH 6.5, 2E-6 M Ca gegen pH 6.5, 2E-6 M Ca, I; I'; II; Dauerlicht, 295 K.

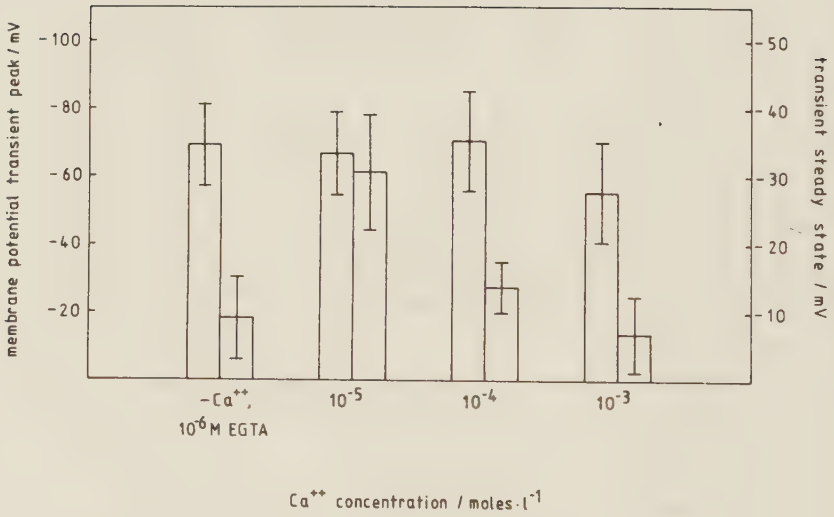


Fig. 22. Hyperpolarisationen des Membranpotentials von Rhizoiden nach Wechsel vom Inkubationsmedium I, pH 7, 1E-6 M Ca auf gleiche Testlösungen unterschiedlicher Ca-Konzentration. Der jeweils linke Block eines Paares zeigt die maximale Hyperpolarisation im transient, der rechte das darauf erreichte steady state; negative Vorzeichen bedeuten Hyperpolarisation gegenüber der Kontrolle; Fehlerbalken: Standardabweichung der Einzelmessung; Dauerlicht, 295 K.

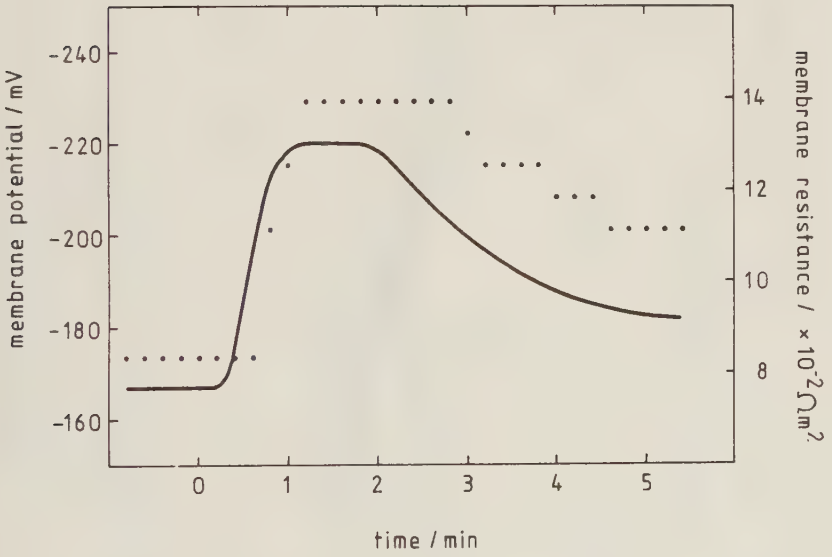


Fig. 23. Änderung des Membranpotentials (durchgezogene Kurve) und des Membranwiderstandes (Punkte) einer Rhizoidzelle nach Austausch des Inkubationsmediums I, pH 7, 1E-5 M Ca gegen I, pH 7, 1E-3 M Ca; Dauerlicht, 295 K.

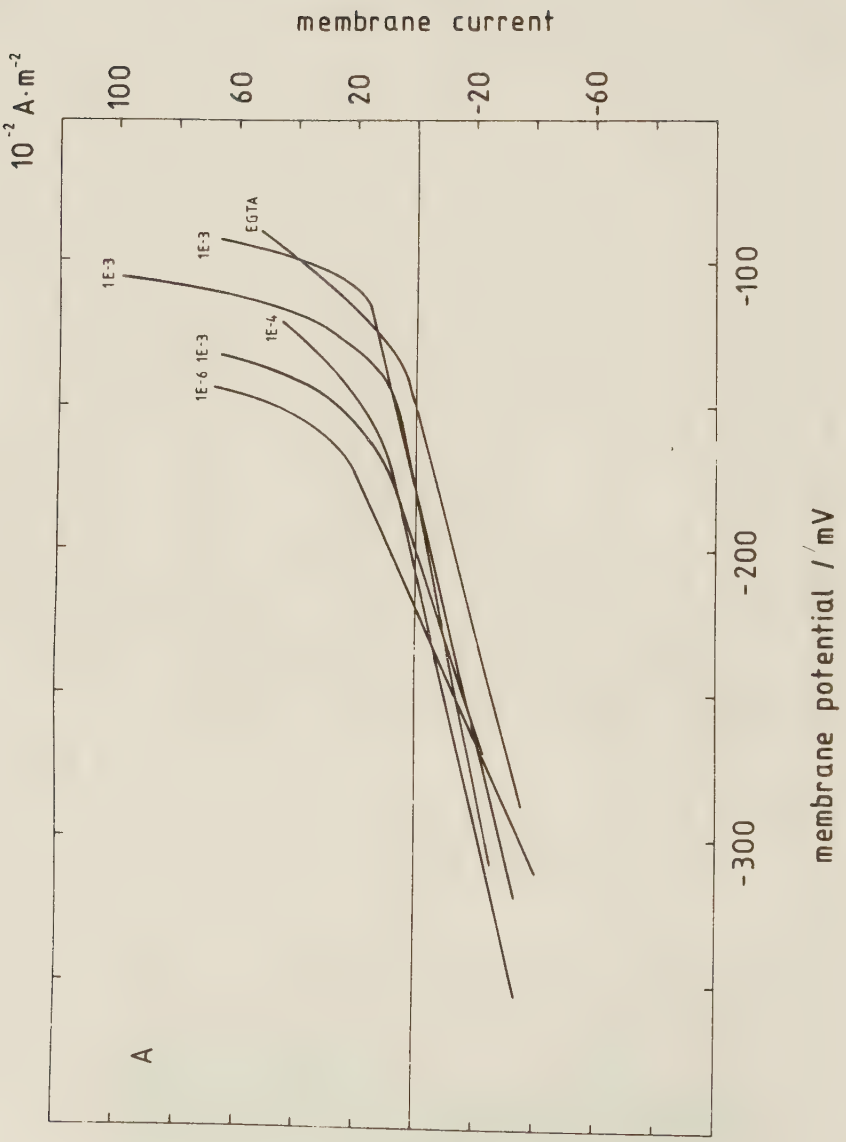
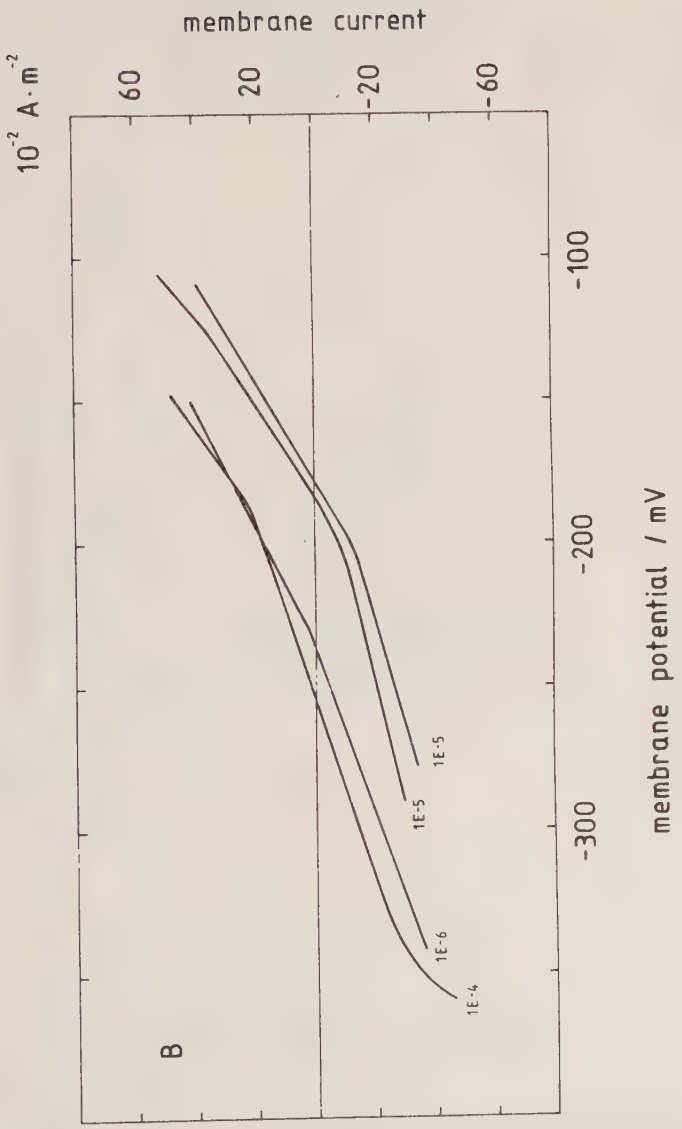
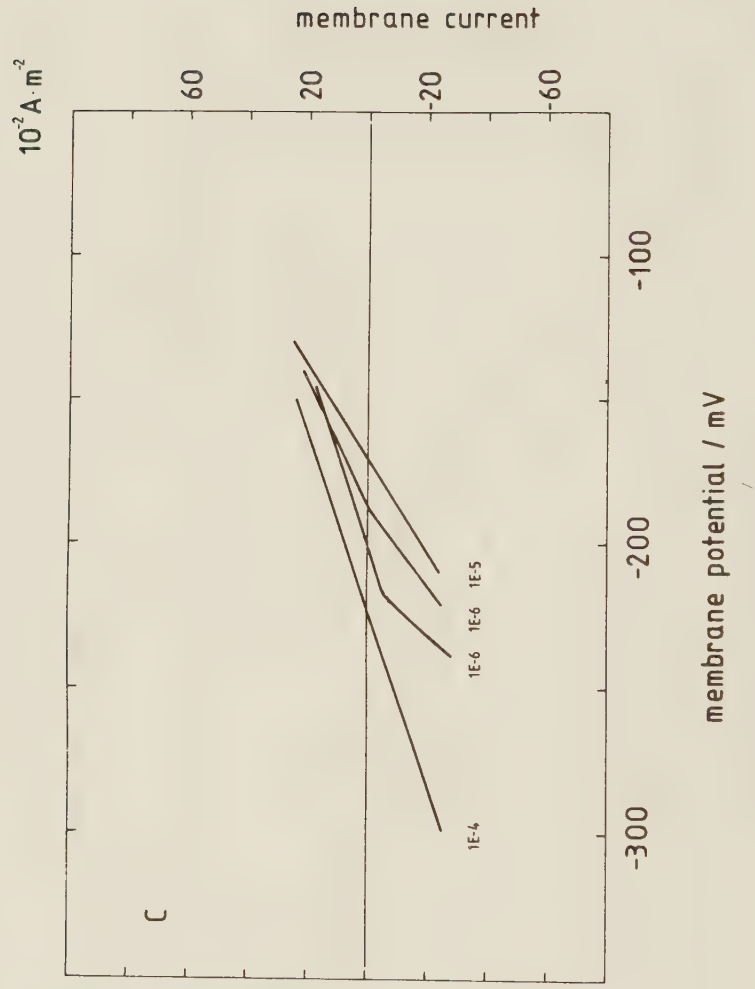


Fig. 24. I/U-Kennlinien von Rhizoiden; jede Serie ist an einer Zelle aufgenommen; korrigiert nach Cole (s. Anhang 2.). Nach jedem Austausch wurde die Kennlinie erneut aufgenommen. Änderung im Strom/Spannungs- Verhalten nach Austausch des Inkubationsmediums

A. I, pH 7, 1E-3 M Ca gegen I,pH 7, 1E-4 M Ca; 1E-6 M Ca; Ca-freies Medium (EGTA).



B. I, pH 7, 1E-5 M Ca gegen I, pH 7, 1E-4 M Ca; 1E-6 M Ca.



C. I, pH 7, 1E-6 M Ca gegen I, pH 7, 1E-4 M Ca; 1E-5 M Ca.

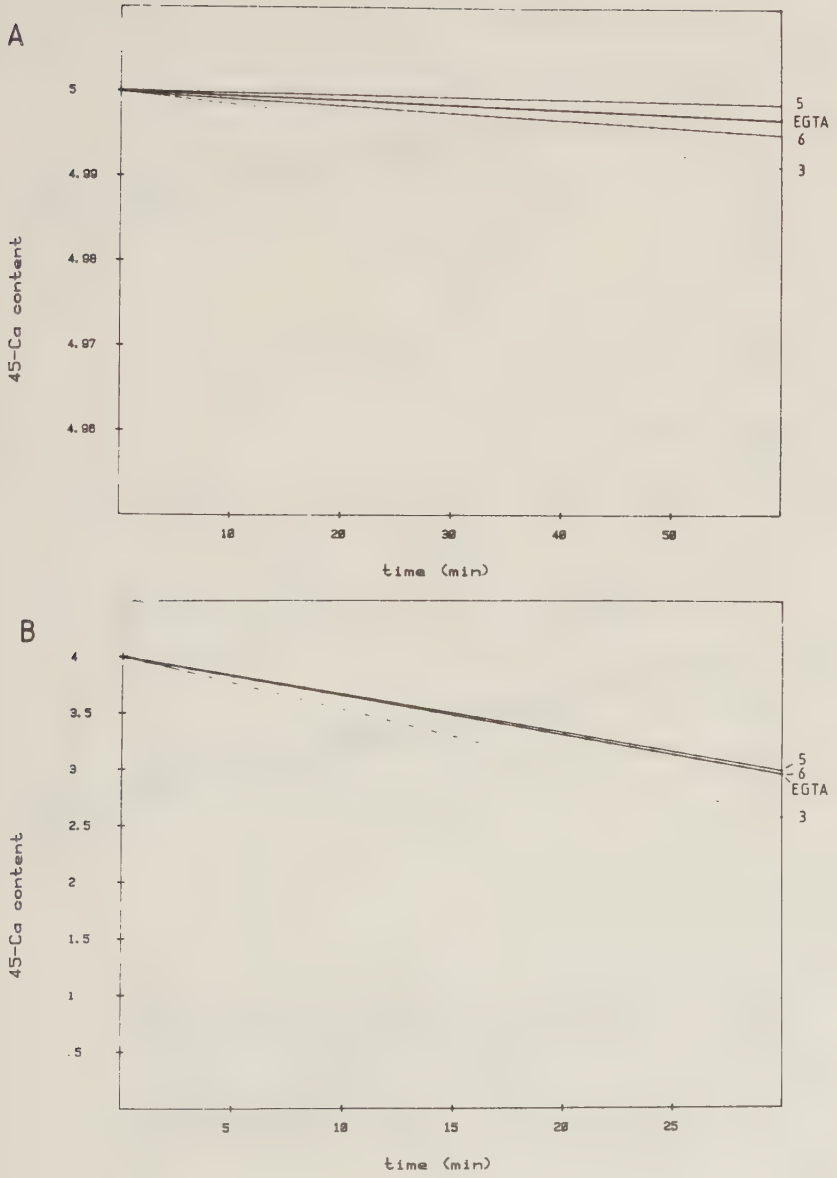


Fig. 25. Ca-45 Effluxkinetik über

A. den Tonoplasten;

B. das Plasmalemma.

Indices: -lg (Ca) im Inkubationsmedium, EGTA ist Ca-freies Medium; Inkubationsmedium I, pH 7; Dauerlicht, 295 K.

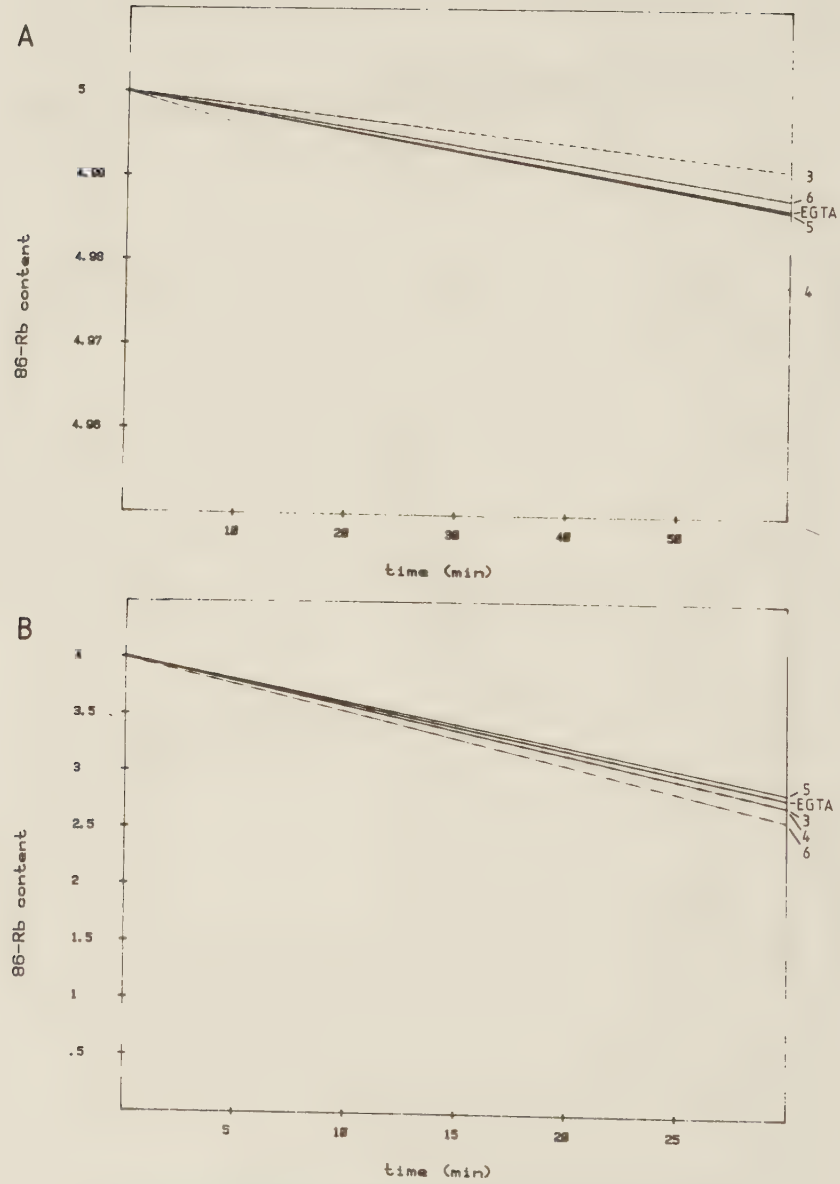


Fig. 26. Rb-86 Effluxe über

A. den Tonoplasten;

B. das Plasmalemma.

Indices: -lg (Ca) im Inkubationsmedium, EGTA ist Ca-freies Medium; Inkubationsmedium I, pH 7; Dauerlicht, 295 K.

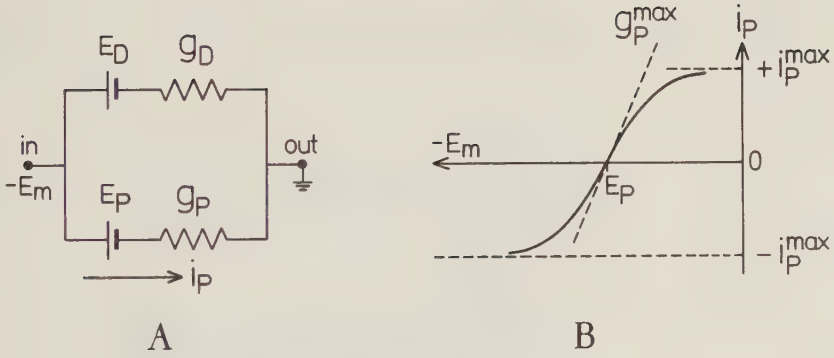


Fig. 27. A. Vereinfachtes Ersatzschaltbild, das durch passiven (Index d) bzw. aktiven (p) Transportweg das elektrische Membranverhalten charakterisiert. Nach BENTRUP, 1975.

B. I/U-Kennlinie der elektrogenen Pumpe. Der Schnittpunkt der Kurve mit der Abszisse definiert die EMK der Pumpe. Nach BENTRUP, 1975.

Lebenslauf.

08.12.1947	geb. in Oldenburg i.O. als Sohn des Hermann Lühring und seiner Frau Elvira geb. Poranski
1954 - 1958	ev. Volksschule, Velbert
1958 - 1967	Städt. neuspr. Jungen - Gymnasium, Velbert
1967	Abitur
1967 - 1969	Grundwehrdienst
1969 - 1972	Biologiestudium, Universität Köln
1971	Vordiplom
1972 - 1974	Neuimmatrikulation und Biologiestudium, Universität Tübingen
1974	Diplomprüfung
1974 - 1976	Diplomarbeit in Biologie über das Thema 'Anwendung der Mikroelektrodentechnik zur Messung des intrazellulären pH bei Riccia fluitans' unter der Anleitung von Prof. Dr. F.W. Bentrup
1977 -1981	Anfertigung der vorliegenden Arbeit am Lehrstuhl für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie im Institut für Biologie I der Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. F.W. Bentrup

Akademische Lehrer:
Baudler, Bentrup, L.Bergmann, Egelhaaf, Engelmann, Engländer, L.Jaenicke, Jahrreiß, Johnen, Kalmring, Kowallik, Mühleisen, Müller-Hill, Napp-Zinn, Neumann, Neuwirth, Oberhammer, Oelkrug, Overath, K.Rajewsky, Reznik, Ruppel, Schief, Schwemmle, Schwartzkopff, Speidel, Starlinger, Thurm, Vielmetter, Weitzel, Woermann.